

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

C12Q 1/32

C12Q 1/26

C12Q 1/00

G01N 33/53

[21] 申请号 02826808.3

[43] 公开日 2005 年 5 月 4 日

[11] 公开号 CN 1612937A

[22] 申请日 2002.11.6 [21] 申请号 02826808.3

[30] 优先权

[32] 2001.11.6 [33] US [31] 10/012,762

[86] 国际申请 PCT/US2002/035777 2002.11.6

[87] 国际公布 WO2003/040694 英 2003.5.15

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.6

[71] 申请人 凯奇股份有限公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 H·K·韦伯 J·欧文斯

R·里德克 D·弗里斯特

M·莱加兹 G·川崎 S·罗森

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 11 页 说明书 64 页 序列表 18 页
附图 9 页

[54] 发明名称 用于高半胱氨酸和胱硫醚的酶促循环测定

[57] 摘要

本发明提供酶促循环测定用于评估溶液中高半胱氨酸和/或胱硫醚的量，如血液、血液衍生物或尿。测定包括步骤：含高半胱氨酸和/或胱硫醚溶液接触 CBS 或其衍生物、L-丝氨酸和 CBL 或其衍生物以形成反应混合物，接触时间足以催化高半胱氨酸形式循环转变成胱硫醚且胱硫醚再转变成高半胱氨酸并产生丙酮酸和氨；确定反应混合物中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量；在形成的丙酮酸和/或氨量的基础上确定溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量。也提供 CBS 或其衍生物和 CBL 或其衍生物的表达载体和分离过程以及进行测定的测试试剂盒。在较佳实施方案中，测定可用最少的酶在 15 分钟或更少进行中。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种评估溶液中高半胱氨酸和/或胱硫醚量的酶促循环测定，其特征在于，所述测定包括：
- 5 (a) 含高半胱氨酸和/或胱硫醚的溶液接触胱硫醚 β -合酶或其衍生物、L-丝氨酸和胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物以形成反应混合物，接触时间足以催化高半胱氨酸循环转变成胱硫醚且胱硫醚再转变成高半胱氨酸并产生丙酮酸和氨；
- (b) 确定反应混合物中存在的丙酮酸和/或氨的量；
- (c) 在产生的丙酮酸和/或氨量的基础上评估溶液中存在的高半胱氨酸和/或
- 10 胱硫醚的量。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，L-丝氨酸加入反应混合物至终浓度至少约 $1\ \mu\text{M}$ 到约 50mM 。
3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述 L-丝氨酸加入反应混合物至终浓度至少约 $10\ \mu\text{M}$ 到约 40mM 。
- 15 4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，丙酮酸的量通过丙酮酸酶促转变成乳酸来确定。
5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，丙酮酸转变成乳酸是通过加入乳酸脱氢酶或其衍生物以及 NADH 或其衍生物。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述乳酸脱氢酶加入反应混合物
- 20 至终浓度至少约 $30\ \text{U/l}$ 到约 $5000\ \text{U/l}$ 。
7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述乳酸脱氢酶加入反应混合物至终浓度至少约 $30\ \text{U/l}$ 到约 $3000\ \text{U/l}$ 。
8. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述 NADH 加入反应混合物至终浓度至少约 0.1mM 到约 2mM 。
- 25 9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述 NADH 加入反应混合物至终浓度至少约 0.1mM 到约 1.5mM 。
10. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，NADH 或其衍生物氧化成 NAD^+ 或其衍生物的总量是通过 NAD^+ 或其衍生物与氧化时能进行颜色变化的染料反应确定的。
- 30 11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述染料选自 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)、2,6-二氯苯醌酚、四唑氮化合物、吩嗪硫酸甲酯、甲基紫精或各自

的衍生物。

12. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 丙酮酸的量是通过丙酮酸酶促转变成过氧化氢确定的。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述酶是丙酮酸氧化酶。

5 14. 如权利要求 13 所述的方法, 其特征在于, 测定进一步包括过氧化物酶和水溶性氢供体, 供体提供氢时形成可分光光度检测的稳定有色产物。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 水溶性氢供体是 N-烷基-N-磺丙基苯胺的衍生物。

10 16. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, N-烷基-N-磺丙基苯胺是 N-乙基-N-(2-羟基 3-磺丙基)-m-甲苯胺的钠盐。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 进一步包括用还原剂处理溶液的步骤, 处理时间足以还原大体上所有任何高半胱氨酸且溶液中存在的含半高半胱氨酸的混合二硫化物还原成高半胱氨酸。

15 18. 如权利要求 17 所述的方法, 其特征在于, 所述处理步骤在步骤 (a) - (c) 前进行。

19. 如权利要求 17 所述的方法, 其特征在于, 所述还原剂包括硼氢化盐或硫醇还原剂。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述还原剂选自 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、TCEP 或硫代乙酸或各自的衍生物。

20 21. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述二硫苏糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

22. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述二硫赤藓糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

25 23. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述硫代乙酸存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

24. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述 β -巯基乙醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

25. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述 TCEP 存在的量从约 6mM 到约 53mM。

30 26. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 确定氨量通过氨传感器、微扩散测定、比色测定或酶测定。

27. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 进一步包括用试剂处理溶液的步骤, 试剂包括胱硫醚 γ -裂合酶或其衍生物, 处理时间足以使溶液中存在的任何胱硫醚转变成 α -酮戊二酸。

28. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 所述处理步骤步骤 (a) - (c) 5 前进行。

29. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 进一步包括去除大体上所有胱硫醚 γ -裂合酶或其衍生物活性的步骤, 它在所述处理步骤后并在步骤 (a) - (c) 进行前。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 γ -裂合酶活性通过 10 加热去除。

31. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶或其衍生物或胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物作为分离自真核细胞或原核细胞的提取物提供。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 所述真核细胞包括酵母细胞。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其特征在于, 所述酵母细胞包括酿酒酵母。

34. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 所述原核细胞包括细菌细胞。 15

35. 如权利要求 34 所述的方法, 其特征在于, 所述细菌细胞选自大肠杆菌、流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)、豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 或鸟博德特氏菌 (*Bordetella avium*) 细胞。

36. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶或其衍生物 20 或胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物从所述提取物中充分分离。

37. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶或其衍生物或胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物通过重组表达基因产生, 基因编码胱硫醚 β -合酶或其衍生物或胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶或其衍生物 25 和胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物作为融合蛋白产生。

39. 如权利要求 38 所述的方法, 其特征在于, 所述融合蛋白表达自重组产生的基因, 基因包括胱硫醚 β -合酶或其衍生物的编码区, 与含编码胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物的基因区操作地相联。

40. 如权利要求 39 所述的方法, 其特征在于, 所述融合蛋白固定在固体支持 30 物上。

41. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶加至约 0.1 KU/1

到约 100 KU/1 的终浓度。

42. 如权利要求 41 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶加至约 0.5 KU/1 到约 75 KU/1 的终浓度。

43. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -裂合酶加至约 0.01 5 KU/1 到约 100 KU/1 的终浓度。

44. 如权利要求 43 所述的方法, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -裂合酶加至约 0.05 KU/1 到约 50 KU/1 的终浓度。

45. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述反应混合物包括缓冲液。

46. 如权利要求 45 所述的方法, 其特征在于, 所述缓冲液可操作用于维持所 10 述反应混合物的 pH 在约 7 到约 9 间。

47. 如权利要求 45 所述的方法, 其特征在于, 所述缓冲液选自 HEPES、TRIS 和磷酸盐。

48. 如权利要求 47 所述的方法, 其特征在于, 所述 TRIS 的 pH 约 8.4。

49. 如权利要求 45 所述的方法, 其特征在于, 进一步包括加入甘油到所述缓 15 冲液的步骤。

50. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 所述缓冲液浓度从约 0.5%到约 15.0% v/v。

51. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 进一步包括减少所述溶液浊度的 步骤。

52. 如权利要求 51 所述的方法, 其特征在于, 进一步包括使所述溶液接触脂 20 蛋白清除剂的步骤。

53. 如权利要求 51 所述的方法, 其特征在于, 所述试剂包括脂肪酶和 α -环糊 精。

54. 如权利要求 52 所述的方法, 其特征在于, 所述脂蛋白清除剂在所述反应 25 混合物中。

55. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述反应混合物接触去污剂。

56. 如权利要求 55 所述的方法, 其特征在于, 所述去污剂可操作用于减少所 述溶液的浊度。

57. 如权利要求 55 所述的方法, 其特征在于, 所述去污剂选自 Triton X-100、 30 Brij-35 和 Genapol X-80。

58. 如权利要求 57 所述的方法, 其特征在于, 所述去污剂是 Genapol X-80。

59. 如权利要求 58 所述的方法, 其特征在于, 所述 Genapol X-80 存在的浓度从约 0.05 到约 0.5% $\mu\text{mol/L}$ 。
60. 如权利要求 57 所述的方法, 其特征在于, 所述去污剂是 Brij-35。
61. 如权利要求 60 所述的方法, 其特征在于, 所述 Brij-35 存在的浓度从约 0.01 到约 0.5% $\mu\text{mol/L}$ 。
62. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述反应混合物包括磷酸盐。
63. 如权利要求 62 所述的方法, 其特征在于, 所述磷酸盐存在的浓度范围从约 50mM 到约 500mM。
64. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述反应混合物包括 EDTA。
65. 如权利要求 64 所述的方法, 其特征在于, 所述 EDTA 存在的浓度从约 0.5mM 到约 10mM。
66. 如权利要求 65 所述的方法, 其特征在于, 所述 EDTA 存在的浓度从约 2mM 到约 3mM。
67. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述反应混合物包括至少 2 种试剂组合物。
68. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述溶液体积从约 10 μl 到约 40 μl 。
69. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述测定在临床化学分析仪上进行。
70. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述测定不需要脱离仪器步骤。
71. 一种用于评估样品溶液中高半胱氨酸量的测试试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括胱硫醚 β -合酶或其衍生物、L-丝氨酸、胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物。
72. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 进一步包括容纳所述样品的容器。
73. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶存在的终浓度从约 0.1 到约 100 KU/l。
74. 如权利要求 73 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶存在的终浓度从约 0.5 到约 75 KU/l。
75. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述 L-丝氨酸存在的终浓度从约 1 μM 到约 50mM。
76. 如权利要求 75 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述 L-丝氨酸存在的终

浓度从约 10 μ M 到约 40mM。

77. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -裂合酶存在的终浓度从约 0.01 到约 100 KU/1。

78. 如权利要求 77 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -裂合酶存在的终浓度从约 0.05 到约 50 KU/1。

79. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 进一步包括乳酸脱氢酶或其衍生物以及 NADH 或其衍生物。

80. 如权利要求 79 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述乳酸脱氢酶存在的终浓度从约 30 到约 5000 U/1。

81. 如权利要求 80 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述乳酸脱氢酶存在的终浓度从约 30 到约 3000 U/1。

82. 如权利要求 79 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述 NADH 存在的终浓度从约 0.1mM 到约 2mM。

83. 如权利要求 82 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述 NADH 存在的终浓度从约 0.1mM 到约 1.5mM。

84. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 进一步包括氧化时能进行颜色变化的染料。

85. 如权利要求 84 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述染料选自 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)、2,6-二氯苯醌酚、四唑氮化合物、吩嗪硫酸甲酯、甲基紫精或各自的衍生物。

86. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 进一步包括单独的容器, 所述单独容器含还原剂。

87. 如权利要求 86 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述还原剂包括硼氢化盐或硫醇还原剂。

88. 如权利要求 87 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述还原剂选自 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、TCEP 或硫代乙酸或各自的任何盐。

89. 如权利要求 88 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述二硫苏糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

90. 如权利要求 89 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述二硫赤藓糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

91. 如权利要求 88 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述硫代乙酸存在的量

从约 0.2mM 到约 3mM。

92. 如权利要求 88 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述 β -巯基乙醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

93. 如权利要求 88 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述 TCEP 存在的量从约 5 6mM 到约 53mM。

94. 如权利要求 71 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 进一步包括胱硫醚 γ -裂合酶或其衍生物。

95. 如权利要求 72 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶或其衍生物、胱硫醚 β -裂合酶或其衍生物、胱硫醚 γ -裂合酶或其衍生物、乳酸脱氢酶 10 或其衍生物固定在所述容器内。

96. 一种评估样品中高半胱氨酸量的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

(a) 使样品接触还原剂, 接触时间足以从高半胱氨酸结合蛋白中释放还原高半胱氨酸;

(b) 在有助于所述还原型高半胱氨酸和所述高半胱氨酸代谢物结合转录 15 因子间形成复合体的条件下, 使所述还原型半胱氨酸接触高半胱氨酸代谢物结合转录因子;

(c) 所述样品与共有多核苷酸序列或其衍生物混合, 序列由所述高半胱氨酸/转录因子复合体或其衍生物特异识别, 以便使所述高半胱氨酸/转录因子 20 复合体结合所述共有多核苷酸序列;

(d) 确定由共有多核苷酸序列结合的高半胱氨酸/转录因子复合体的量。

(e) 使所述样品中存在的高半胱氨酸量与所述确定量相互关联。

97. 如权利要求 96 所述的方法, 其特征在于, 所述还原剂包括硼氢化盐或硫醇还原剂。

98. 如权利要求 97 所述的测试试剂盒, 其特征在于, 所述还原剂选自 β -巯基 25 乙醇、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、TCEP 或硫代乙酸或各自的任何盐。

99. 如权利要求 96 所述的方法, 其特征在于, 所述高半胱氨酸代谢物结合转录因子包括 MetR 或其衍生物。

100. 如权利要求 96 所述的方法, 其特征在于, 所述共有多核苷酸序列包括 SEQ ID NO:11 的多核苷酸序列或其衍生物。

101. 如权利要求 96 所述的方法, 其特征在于, 所述高半胱氨酸/转录因子复 30 合体的确定量通过荧光确定。

102. 如权利要求 96 所述的方法, 其特征在于, 所述方法在适于检测所述信号的分析仪上进行。

103. 如权利要求 96 所述的方法, 其特征在于, 所述方法用一种仪器进行。

104. 一种评估样品中高半胱氨酸量的测定, 其特征在于, 所述测定包括步骤:
5 产生反应混合物, 包括所述样品、丝氨酸、乳酸脱氢酶、NADH 和能释放样品中蛋白质-结合高半胱氨酸的还原剂、或它们各自的衍生物;

温育反应混合物, 温育时间足以还原大部分所述蛋白质-结合的高半胱氨酸;

加入酶混合物, 包括胱硫醚 β -合酶和胱硫醚 β -裂合酶或它们各自的衍生物, 使高半胱氨酸循环转变为胱硫醚且胱硫醚再转变成高半胱氨酸, 伴随丙酮酸产生;

10 和

测量随着时间产生的 NAD⁺生成或 NADH 的消失, 作为样品中高半胱氨酸的测量。

105. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述 L-丝氨酸加入反应混合物至终浓度至少约 1 μ M 到约 50mM。

106. 如权利要求 105 所述的测定, 其特征在于, 所述 L-丝氨酸加入反应混合
15 物至终浓度至少约 10 μ M 到约 40mM。

107. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述乳酸脱氢酶加入反应混合物至终浓度至少约 30 U/l 到约 5000 U/l。

108. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述乳酸脱氢酶加入反应混合物至终浓度至少约 30 U/l 到约 3000 U/l。

20 109. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述 NADH 加入反应混合物至终浓度至少约 0.1mM 到约 2mM。

110. 如权利要求 109 所述的测定, 其特征在于, 所述 NADH 加入反应混合物至终浓度至少约 0.1mM 到约 1.5mM。

25 111. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶存在的终浓度从约 0.1 到约 100 KU/l。

112. 如权利要求 111 所述的测定, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -合酶存在的终浓度从约 0.5 到约 75 KU/l。

113. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -裂合酶存在的终浓度从约 0.01 到约 100 KU/l。

30 114. 如权利要 113 所述的测定, 其特征在于, 所述胱硫醚 β -裂合酶存在的终浓度从约 0.05 到约 50 KU/l。

115. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在多达 15 分钟的时间段中完成。

116. 如权利要求 115 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在约 5-12 分钟的时间段中完成。

5 117. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述还原剂选自二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、TCEP 和其组合。

118. 如权利要求 117 所述的测定, 其特征在于, 所述二硫苏糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

10 119. 如权利要求 118 所述的测定, 其特征在于, 所述二硫赤藓糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

120. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在临床化学分析仪上进行。

121. 如权利要求 104 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在单个仪器上进行。

122. 一种评估样品中高半胱氨酸量的测定, 其特征在于, 所述测定包括步骤:
15 产生反应混合物, 包括所述样品、丝氨酸、胱硫醚 β -合酶和胱硫醚 β -裂合酶或它们各自的衍生物, 使高半胱氨酸循环转变为胱硫醚且胱硫醚再转变成高半胱氨酸, 伴随丙酮酸产生, 胱硫醚 β -合酶与胱硫醚 β -裂合酶的比例范围从约 1:1 到 25:1; 和

20 评估所述反应混合物中存在的丙酮酸量, 通过加入乳酸脱氢酶和 NADH 到所述反应混合物并监控所述反应混合物中随着时间产生的 NAD⁺或 NADH 的消失。

123. 如权利要求 122 所述的测定, 其特征在于, 所述测定包括在所述乳酸脱氢酶和 NADH 存在时加入还原剂到反应混合物的步骤, 以减少样品中至少部分蛋白质-结合的高半胱氨酸。

25 124. 如权利要求 123 所述的测定, 其特征在于, 所述还原剂选自二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、TCEP 或硫代乙酸和其组合。

125. 如权利要求 123 所述的测定, 其特征在于, 所述二硫苏糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

126. 如权利要求 125 所述的测定, 其特征在于, 所述二硫赤藓糖醇存在的量从约 0.2mM 到约 3mM。

30 127. 如权利要求 122 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在多达 20 分钟的时间段中完成。

128. 如权利要求 127 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在多达 15 分钟的时间段中完成。

129. 如权利要求 122 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在临床化学分析仪上进行。

5 130. 如权利要求 122 所述的测定, 其特征在于, 所述测定在单个仪器上进行。

131. 一种连续测定含许多液体高半胱氨酸样品的方法, 其特征在于, 所述测定包括步骤:

10 (a) 产生反应混合物, 通过将所述样品之一与丝氨酸、胱硫醚 β -合酶和胱硫醚 β -裂合酶、乳酸脱氢酶、NADH 和能释放样品中蛋白质-结合的高半胱氨酸的还原剂、或它们各自的衍生物一起置于容器中;

(b) 在所述反应混合物中使高半胱氨酸循环转变为胱硫醚且胱硫醚再转变为高半胱氨酸, 伴随丙酮酸产生;

(c) 评估反应混合物中存在的丙酮酸量, 通过监控其中随着时间的 NAD⁺的产生或 NADH 的消失;

15 (d) 对各所述样品重复步骤 (a) - (c), 各所述样品的反应混合物-产生步骤间的时间间隔多达约 15 分钟。

132. 如权利要求 131 所述的方法, 其特征在于, 所述时间间隔多达约 13 分钟。

20 133. 如权利要求 131 所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括步骤: 首先产生第一种反应混合物, 含所述样品、丝氨酸、乳酸脱氢酶、NADH 和所述还原剂, 使所述第一种反应混合物温育一段时间以释放大部分所述蛋白质-结合的高半胱氨酸, 之后加入所述胱硫醚 β -合酶和胱硫醚 β -裂合酶。

134. 如权利要求 131 所述的方法, 其特征在于, 所述反应混合物中胱硫醚 β -合酶与胱硫醚 β -裂合酶的比例从约 1:1 到 25:1。

25 135. 如权利要求 134 所述的方法, 其特征在于, 所述比例从约 1:1 到 10:1。

136. 如权利要求 131 所述的方法, 其特征在于, 所述方法在临床化学分析仪上进行。

137. 如权利要求 131 所述的方法, 其特征在于, 所述方法在单个仪器上进行。

30 138. 一种分离酶, 其特征在于, 所述酶与选自 SEQ ID No19 和 20 的酶有至少约 80% 的序列同一性。

139. 一种分离酶, 其特征在于, 所述酶选自 SEQ ID No19 和 20。

140. 一种使用胱硫醚作为高半胱氨酸测定校准物的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

- (a) 取已知浓度的胱硫醚；
- (b) 加入所述已知浓度到生物样品；
- 5 (c) 用含胱硫醚的所述样品在酶反应中，使胱硫醚转变为高半胱氨酸且高半胱氨酸再转变为胱硫醚，伴随丙酮酸和氨的产生；
- (d) 测量产生的丙酮酸和氨的量；和
- (e) 使用所述测量的丙酮酸或氨的量作为所述高半胱氨酸测定的参考标准。

10 141. 一种控制涉及高半胱氨酸的酶反应总体速度的过程，其特征在于，高半胱氨酸不被酶反应消耗且高半胱氨酸的稳态浓度与这种酶反应总体速度成正比。

142. 一种使用胱硫醚作为高半胱氨酸测定校准物的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

- 加入胱硫醚到高半胱氨酸测定；和
- 15 使用所述测定结果作为高半胱氨酸校准物。

用于高半胱氨酸和胱硫醚的酶促循环测定

相关专利申请

本申请是 2000 年 11 月 1 日提交的美国专利申请序列号 09/704,036 的部分继续申请,该专利申请要求 1999 年 11 月 2 日提交的临时专利申请序列号 60/163,126 和 2000 年 5 月 10 日提交的序列号 60/203,349 的权利,前面各申请的内容和讲授纳入本文供参考。

序列列表

与本发明有关的含 21 种序列的序列列表以计算机可读的 ASCII 文档形式纳入本文供参考并附加两张(2)根据 37CFR 1.821(c)的原始光盘、其根据 37CFR 1.821(e)的相同拷贝以及一张(1)其根据 37CFR 1.52(e)的相同拷贝。

发明的背景

人血浆中高半胱氨酸的高水平与冠心病、中风、动脉硬化和其它疾病的风险增加相关。结果需要筛选此氨基酸量提高的一般群体。为使大规模测试高半胱氨酸可行,需要开发新和花费更少的测定。

常规测量血浆高半胱氨酸是通过高压液相层析(HPLC)和气相层析/质谱(GC/MS),花费超过 100 美金每测定,使这些物理分离方法对于广泛群体研究花费太高。例如,可制备尿或血液样品用于氨基酸层析,通过 HPLC 分离和检测来测量 L-高半胱氨酸。Fiskerstrand 等. (*Clin. Chem.*, 39:263-271(1993)) 描述了测定 L-高半胱氨酸的方法,用荧光标记血清硫醇,接着通过 HPLC 分离和检测来自多种其它含硫化合物的高半胱氨酸衍生物。然而,这种方法通常费时、昂贵且不易为许多实验室所采用。

也开发了间接免疫测定高半胱氨酸,然而这些抗体方法仍相对昂贵,约 24 美金每测试。一种特定间接免疫测定使高半胱氨酸酶促转变成腺苷高半胱氨酸且腺苷高半胱氨酸的量通过竞争性 ELISA(酶联免疫测定)确定,使用抗腺苷高半胱氨酸抗体(例如参见美国专利 5,827,645,其内容纳入本文供参考)。

已开发间接酶测定用于定量 L-高半胱氨酸。例如，酶 S-腺苷-高半胱氨酸水解酶和腺苷加入测试样品。反应混合物中所得腺苷浓度或浓度变化用作样品中高半胱氨酸起始浓度的指示。

也报导了直接酶测定用于测量高半胱氨酸。通常，这些操作使高半胱氨酸不可逆地转变成其它可定量的化合物。例如，酶高半胱氨酸脱水酶用于从高半胱氨酸中去除巯基。然后测量取出的巯基部分的浓度。此时和其它，酶用于高半胱氨酸测定的主要缺点是所用酶与其它含硫的高半胱氨酸相关氨基酸和化合物反应，导致背景高且不一致以及血浆的高半胱氨酸测量不精确。

已报导酶促（或酶）循环测定用于很少量的分析物。在酶促循环测定中，使用两种或多种酶活性，重复利用底物且不可逆地转变测量的化合物。催化使用“化合物”以控制转变成测定中定量化合物的速度。结果，感兴趣的分析物保持稳态浓度，浓度足够低以产生准一级（pseudo-first order）反应速度。因此分析物稳态浓度与总体测定的速度线性相关。通过测量反应速度可容易地确定分析物的量。酶促循环测定有时称为“扩增”测定，因为方法通常使分析物的测量敏感性增加 100 到 1000 倍。测量中的扩增是不减少化合物的稳态浓度的直接结果。没未报导酶促循环测定用于测量高半胱氨酸。

本发明提供花费较少的酶促循环测定用于高半胱氨酸和/或胱硫醚，提供的样品通量高于目前采用的诊断测定。此外，发明提供重组生产酶的方法和载体以及评估样品中高半胱氨酸和胱硫醚的量的测试试剂盒，酶可用于生产测定试剂。

发明的概述

本发明提供酶促循环测定用于评估溶液中高半胱氨酸和/或胱硫醚的量。测定利用高半胱氨酸和 L-丝氨酸反应通过酶胱硫醚 β -合酶（CBS）或其衍生物形成胱硫醚，通过胱硫醚 β -裂合酶（CBL）使胱硫醚酶促转变成高半胱氨酸、丙酮酸和氨。测定提供高半胱氨酸和/或胱硫醚的稳态浓度，稳态浓度与与总体反应速度线性相关。样品中确定的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量以形成的丙酮酸和/或氨的量或从反应混合物中取出的丝氨酸的量为基础。用本发明测定的能测试溶液可包括血液、血清、血浆、尿和其它生物样品的实验室样品。此外，可测试任何其它液体样品。

在一个实施方案中，本发明提供评估溶液中高半胱氨酸和/或胱硫醚的量的方法，包括步骤：

(a) 含高半胱氨酸和/或胱硫醚溶液接触（进行二硫化物还原步骤前和/或后）CBS 或其衍生物、L-丝氨酸和 CBL 或其衍生物以形成反应混合物，接触时间足以催化高半胱氨酸循环转变成胱硫醚且胱硫醚再转变成高半胱氨酸并产生丙酮酸和氨；

(b) 确定反应混合物中存在的丙酮酸和/或氨的量；

(c) 在形成的丙酮酸和/或氨量的基础上评估溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量。

更特别的是，方法通过加入便宜的氨基酸 L-丝氨酸提供高半胱氨酸量的评估。反应混合物中存在的丙酮酸量可以一些方法测量。在本发明的一个特定实施方案中，乳酸脱氢酶（LDH）或其衍生物和 NADH（还原的烟酰胺辅因子）或其衍生物存在于反应混合物中。NADH 存在时，LDH 使丙酮酸转变成乳酸，NADH 氧化成 NAD⁺（氧化的烟酰胺辅因子）。

NADH 氧化成 NAD⁺可通过本领域一些已知的方法测量，包括在 340nm 监控反应混合物。也可通过氧化染料以产生可观察的颜色变化来监控 NAD⁺的产生。优选用于本发明的染料包括但不限于 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)、2,6-二氯苯醌酚、四唑氮化合物、吩嗪硫酸甲酯、甲基紫精或任何这些染料的衍生物。溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量以观察到的颜色强度与标准曲线相比为基础，标准曲线构建用于已知浓度分析物的样品。

在另外的实施方案中，丙酮酸氧化酶和辣有过氧化物酶在过氧化氢和色原存在时用于检测样品中存在的丙酮酸量。N-乙基-N-(2-羟基 3-磺丙基)-m-甲苯胺钠 (TOOS) 和其它 N-乙基-N-(2-羟基 3-磺丙基)-苯胺衍生物是此比色反应的优选色原。如上所述，样品中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚量以观察到的颜色强度与标准曲线相比为基础，标准曲线构建用于已知浓度分析物的样品。

溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚量也可在反应混合物中存在的氨量基础上测量。确定溶液中氨浓度的方法有很多。在本发明的一个特定实施方案中，测量氨量使用普遍可用的标准氨传感器。

在另一个实施方案中，本发明涉及评估样品中高半胱氨酸和/或胱硫醚量的方法，包括步骤：溶液接触还原剂，接触时间足以还原大体上所有的高半胱氨酸且使溶液中存在的其它二硫化物还原成高半胱氨酸。还原剂处理也可用于释放高半胱氨酸，高半胱氨酸经二硫键附于溶液中存在的蛋白质和/或其它分子。还原后，溶液然后接触 CBS 或其衍生物、L-丝氨酸和 CBL 或其衍生物，接触时间足以催化

高半胱氨酸循环转变成胱硫醚且胱硫醚转变成高半胱氨酸并产生丙酮酸和氨。为评估溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚量，反应混合物中存在的丙酮酸和/或氨量可如上确定。用于本发明的优选还原剂包括氢硼化盐和硫醇还原剂。适用于本实施方案的典型硫醇还原剂包括二硫赤藓糖醇（DTE）、二硫苏糖醇（DTT）、 β -巯基乙醇（ β ME）、tris-(羧乙基)磷化氢盐酸盐(TCEP)或硫代乙酸或它们的衍生物等。

在另外一个评估溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚量的实施方案中，溶液可用胱硫醚 γ -裂合酶（CGL）或其衍生物预处理足够的时间以通过胱硫醚转变成 α 酮戊二酸从反应混合物中去除任何胱硫醚。胱硫醚去除后，胱硫醚 γ -裂合酶从反应混合物中去除或破坏。在一个典型的实施方案中，破坏胱硫醚 γ -裂合酶通过加热溶液足够的时间以大体上去除其酶活性。胱硫醚 γ -裂合酶也可在不溶底物或表面上固定，例如容易去除微粒或珠。

在本发明另一个实施方案中，提供评估溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚量的方法，包括使溶液与L-丝氨酸和CBS或其衍生物及CBL或其衍生物反应，CBL固定在固体表面上。固体表面可以是例如纸、滤纸、尼龙、玻璃、陶瓷、硅石、氧化铝、硅藻土、纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚氯乙烯和它们的衍生物。固体表面可以是测试容器的侧面和底部或可以是加入测试容器的物质。在较佳实施方案中，固体表面包括加入测试容器的珠。

用于本发明的CBS或其衍生物、CBL或其衍生物、胱硫醚 γ -裂合酶或其衍生物可作为粗提物从细胞获得。在本发明的一个实施方案中，胱硫醚 β -裂合酶（CBS）或其衍生物、胱硫醚 β -裂合酶（CBL）和/或胱硫醚 γ -裂合酶（CGL）纯化自人、酵母或细菌细胞。在本发明的一个特别较佳实施方案中，编码酶的基因被分离或合成且在宿主细胞中表达为重组蛋白。特别优选的是编码亲和标记的DNA序列加入基因构建物以协助纯化和/或检测重组产生的酶。重组方法也可用于提供融合蛋白，在单个蛋白质中包括CBS和CBL的酶活性。也可包含亲和标记作为部分融合蛋白构建物以协助纯化融合蛋白。

本发明也提供评估样品中高半胱氨酸量的方法，此测定形式与高半胱氨酸/转录因子复合体的量相关，复合体结合共有多核苷酸结合序列。在特定实施方案中，方法包括使样品接触还原剂一段足够时间以从任何相关蛋白质中释放高半胱氨酸；在有助于复合体形成的条件下还原高半胱氨酸接触高半胱氨酸代谢物结合转录因子，样品与共有多核苷酸序列混合，序列由高半胱氨酸/转录因子复合体特异

识别；从结合共有多核苷酸序列的高半胱氨酸/转录因子复合体的量评估样品中存在的高半胱氨酸量。可应用于方法的还原剂包括二硫赤藓糖醇（DTE）、二硫苏糖醇（DTT）、 β -巯基乙醇、tris-(羧乙基)磷化氢(TCEP)或硫代乙酸或各自的任何盐等。高半胱氨酸代谢物结合/转录因子包括识别共有多核苷酸序列的大肠杆菌 MetR, 例如 SEQ ID NO:11 所述多核苷酸序列(Marconi 等., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175:1057- 1063(1991)) 或其衍生物。

本发明的另一个实施方案提供的测试试剂盒包括保持待评估溶液的容器以及提供有助于高酶活性条件所需的任何缓冲液、辅助物质和溶剂, 评估溶液中高半胱氨酸和/或胱硫醚、L-丝氨酸、CBS 或其衍生物、CBL 或其衍生物的量。测试试剂盒可进一步包括乳酸脱氢酶或其衍生物和 NADH 或其衍生物。当氧化可包括时, NADH 可在 340nm 直接测量或用能提供颜色改变的染料。高半胱氨酸和/或胱硫醚的量与吸光度测量随着时间的变化相关。

在一个较佳实施方案中, 提供的酶固定于固体支持物。固体支持物可包括保持测试样品的容器表面或可以是珠或其它加入容器的物品。在本发明的另一个实施方案中, 可提供胱硫醚 γ -裂合酶作为部分试剂盒以在酶促循环测定前从测试溶液中去掉任何胱硫醚。在加入高半胱氨酸酶促循环的剩余成分前, 大体上所有的胱硫醚 γ -裂合酶或其衍生物活性必须从反应混合物中去除或破坏。

发现发明的优选测定可在相对短的时间段和用相对少量的酶完成, 使测定有显著的商业优势。例如, 优选测定涉及反应混合物的产生, 混合物包括含高半胱氨酸的样品、丝氨酸、CBS、CBL、乳酸脱氢酶、NADH 和还原剂如 DTE、DTT, 混合物中 CBS/CBL 比例从约 1:1 到 25:1, 更优选从约 1:10, 最优选从约 2:1 到 5:1。有利的是, 已发现还原剂可与检测系统(即乳酸脱氢酶和 NADH)一起存在而没有不利影响测定。因此, 进行发明的测定可没有单独的还原步骤, 从而减少总测定次数。因而, 当许多样品通过在容器(如分光光度样品池)中连续产生反应混合物测定时, 混合物由样品、丝氨酸、CBS、CBL、乳酸脱氢酶、NADH 和还原剂组成, 评估产生反应混合物中存在的丙酮酸量是通过监控 NAD⁺随着时间的产生, 各自反应-产生步骤间的时间间隔可以短至 10-50 秒, 特定样品的总反应时间至约 20 分钟。特定样品的总反应时间更优选至约 15 分钟, 更加优选至约 13 分钟。较慢仪器的每小时总样品数可以是约 15-30 个, 但对于更快仪器高达 200-400 个。在此优选测定中, 制备的第一种反应混合物包括样品、丝氨酸、乳酸脱氢酶、NADH 和还原剂, 适当温育一段时间以释放样品中以结合、氧化和/或游离状态存在的大部

分（优选所有）高半胱氨酸（总高半胱氨酸）。因此，加入 CBS 和 CBL 以完成反应混合物并起始高半胱氨酸和/或胱硫醚的酶促循环。

在另一个较佳实施方案中，胱硫醚可用于产生酶测定的校准物（因为酶促循环测定使高半胱氨酸和胱硫醚互变）。换句话说，多种已知水平的胱硫醚可用于测定系统以“校准”或“标准化”测定和/或可定量样品结果的仪器。在此实施方案中，已知浓度的胱硫醚加入生物样品，然后进行用于一个其它实施方案的测定。结果用于确定校准线，由于两条线间的高度相关性，校准线然后用于确立高半胱氨酸线。另外，已知水平的胱硫醚可用作质量控制测量，以确保测定正常地工作。在此质量控制实施方案中，这些“已知”水平的胱硫醚作为未知样品被测定，结果与它们已知（预期）值比较以确保测定系统正常地发挥功能。

优选测定是用分离（纯化）CBL 和 CBS 酶完成的，这些酶与选自 SEQ ID Nos. 19 和 20 的酶有至少约 80%（优选至少约 90%）的序列同一性。如本文所用，“序列同一性”如本领域已知，指两种或多种蛋白质或多肽序列或两种或多种多核苷酸序列间的关系，即参考序列和与参考序列比较的特定序列。确定序列同一性通过在最佳排列序列以产生最高程度序列相似性后比较特定序列和参考序列，序列相似性由这些序列串间的配对确定。这样排列时，序列同一性在位置-位置基础上确定，例如如果核苷酸或氨基酸残基在特定位置相同，序列在此位置“相同”。然后这种位置同一性的总数除以参考序列中的核苷酸或残基总数以给出%序列同一性。序列同一性可通过已知方法计算，包括但不限于《计算分子生物学》(Computational Molecular Biology)，Lesk, A. N., 主编., Oxford University Press, New York (1988), 《生物计算：信息学和基因组计划》(Biocomputing: Informatics and Genome Projects), Smith, D. W., 主编., Academic Press, New York (1993); 《计算机分析序列数据》(Computer Analysis of Sequence Data), 第 1 部分, Griffin, A. M. 和 Griffin, H. G., 主编., Humana Press, New Jersey (1994); 《分子生物学的序列分析》(Sequence Analysis in Molecular Biology), von Heinge, G., Academic Press, New York (1987); 《序列分析引物》(Sequence Analysis Primer), Griboskov, M. 和 Devereux, J., 主编., M. Stockton Press New York (1991); Carillo, H., 和 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988), 所讲授的纳入本文供参考。设计确定序列同一性的优选方法以给出测试序列间的最大配对。确定序列同一性的方法编纂入可公开获得的计算机程序，程序确定特定序列间的序列同一性。这种程序的例子包括但不限于 GCG 程序包 (Devereux, J.,

等., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S. F. 等., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)。BLASTX 程序可公开获得自 NCBI 和其它来源 (BLAST 手册, Altschul, S. 等., NCVINLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. 等., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), 所讲授的纳入本文供参考)。这些程序用默认间隔重量最佳排列序列以便产生特定和参考序列间最高水平的序列同一性。例如, 多核苷酸的核苷酸序列与参考核苷酸序列有至少 95%的“序列同一性”, 则特定多核苷酸的核苷酸序列与参考序列相同, 除非特定多核苷酸序列可包括多达 5 个点突变每 100 个参考核苷酸序列的核苷酸。换句话说, 核苷酸序列相对参考核苷酸序列有至少 95%同一性的多核苷酸中, 参考序列中多达 5%的核苷酸可缺失或由另外核苷酸取代, 或者参考序列中多达 5%总核苷酸的一些核苷酸可插入参考序列。这些参考序列的突变可在参考核苷酸序列的 5'或 3'末端位置或末端位置间任何地方发生, 单独散布在参考序列的核苷酸中或在参考序列的一个或多个毗连基团中。类似地, 具有特定氨基酸序列的多肽与参考氨基酸序列有至少例如 95%的“序列同一性”, 则多肽的特定氨基酸序列与参考序列相同, 除非特定多肽序列可包括多达 5 个氨基酸改变每 100 个参考氨基酸序列的氨基酸。换句话说, 为获得与参考氨基酸序列有至少 95%序列同一性的特定多肽序列, 参考序列中多达 5%的氨基酸残基可缺失或由另外氨基酸取代, 或者参考序列中多达 5%总氨基酸残基数的一些氨基酸可插入参考序列。这些参考序列的改变可在参考氨基酸序列的氨基或羧基末端位置或这些末端位置间任何地方发生, 单独散布在参考序列的残基中或在参考序列的一个或多个毗连基团中。优选的是, 不相同的残基位置由保守性氨基酸取代区别。然而, 在确定序列同一性时, 保守性取代不包括作为配对。

用于本发明的试剂包括 CBS、CBL、L-丝氨酸、LDH、NADH、DTE、 β ME、DTT、TCEP、硫代乙酸和 CGL。用于本发明的 CBS 酶浓度范围从约 0.1 到约 100 KU/l。CBS 浓度更优选从约 0.5 到约 75 KU/l, 更加优选从约 1 到约 50 KU/l。CBS 浓度最优选从约 1 到约 30 KU/l。用于本发明的 CBL 酶浓度范围从约 0.01 到约 100 KU/l。CBS 浓度更优选从约 0.05 到约 50 KU/l, 更加优选从约 0.1 到约 30 KU/l。CBS 浓度最优选从约 0.1 到约 15 KU/l。L-丝氨酸可以约 1 μ M 到约 50mM 的终浓度存在。L-丝氨酸更优选以约 10 μ M 到约 40mM 的终浓度加入, 更加优选约 100 μ M 到约 20mM 的终浓度。加入的 L-丝氨酸终浓度最优选从约 0.2mM 到约 10mM。当用于任何实施方案时, LDH 以约 30 到约 5000 U/L 的终浓度存在于反应混合物中。反应混合物中

存在的 LDH 终浓度更优选从约 30 到约 3000U/L, 更加优选从约 50 到约 2500U/L。反应混合物中存在的 LDH 终浓度最优选从约 100 到约 2000U/L。另外, 当 NADH 用于任何实施方案时, 反应混合物中存在的 NADH 量可在约 0.1mM 到约 2mM 间变化。反应混合物中存在的 NADH 终浓度更优选从约 0.1mM 到约 1.5mM, 更加优选约 0.1 到约 1mM 间。反应混合物中存在的 NADH 终浓度最优选从约 0.2 到约 0.8mM。当 DTE 用于本发明时, 它的终浓度范围可从约 0.01mM 到约 100mM。DTE 浓度范围更优选从约 0.01mM 到约 50mM, 更加优选从约 0.1mM 到约 25mM。DTE 终浓度范围最优选从约 0.1mM 到约 10mM。类似地, 当 DTT 用于本发明时, 它的终浓度范围可从约 0.01mM 到约 100mM。DTT 浓度范围更优选从约 0.01mM 到约 50mM, 更加优选从约 0.1mM 到约 25mM。DTT 终浓度范围最优选从约 0.1mM 到约 10mM。最后, 当 CGL 用于本发明时, 它的终浓度范围可从约 0.1 KU/1 到约 100 KU/1。CGL 范围更优选从约 0.5 KU/1 到约 75 KU/1, 更加优选从约 1 KU/1 到约 50 KU/1。CGL 终浓度范围最优选从约 1 KU/1 到约 30 KU/1。

在一些较佳实施方案中, 试剂 1 的缓冲液是 pH8.4 的 250mM TRIS。然而, 当 TRIS 用作缓冲液时, pH 范围可从 7.0-9.0。pH 范围更优选从 7.5-8.5, 更加优选从 8.1-8.5。使用浓度增加的 TRIS 通过协助维持更恒定的 pH 来改进测定一致性, 因为它是更浓缩的缓冲液。另外, CBS 和 CBL 在此优选 pH 范围中显然更具活性, 尤其从约 pH 8.1-8.5。

本发明也提供用混浊样品同样工作很好的测定。通过加入脂肪酶和 α -环糊精到 R1 来减少浊度问题。这些有助于降低浊度, 这是通过甘油三酸酯被脂肪酶水解成甘油和游离脂肪酸以及通过 α -环糊精与游离脂肪酸形成复合体。加入这两种成分有助于在加入试剂 3 前澄清反应混合物。用 EDTA 取代脂肪酶和 α -环糊精提供另一种精确分析混浊样品的方法。

本发明的另一个变化是测试不同体积的试剂的效果。这些变化对测定的精确性没有显著作用。

本发明也测试不同去污剂和其浓度的效果。例如, Genapol X-80 可以约 0.05-0.5% 的浓度存在于试剂 1。浓度更优选在 0.1-0.5% 间, 更加优选在 0.2-0.4% 间。测试其中 3 个浓度 (0.1%、0.3% 和 0.5%), 0.3% 的浓度提供最精确的结果。Brij-35 也在试剂 1 中变化浓度。Brij-35 可用于本发明, 在 R1 中的浓度约 0.01-0.5%。此浓度范围更优选从约 0.015 到约 0.1%, 更加优选从约 0.020 到约 0.030%。测试的浓度 (0.025%、0.05%、0.1% 和 0.5%) 中, 用 0.025% 浓度获得最

精确的一致结果。

本发明也测试用 Tris(2-羧乙基磷化氢)盐酸盐 (TCEP)取代还原剂 DTE, TCEP 在纯化水中稳定一段延长的时间。这种取代使试剂空白反应从约 12-15mA/分钟减少到约 4-5mA/分钟, 使此测定的精确度更高。当 TCEP 用于本发明时, 它的浓度范围可从约 6-53mM。此浓度范围更优选从约 10-45mM, 更加优选从约 20-30mM。在此专利申请测试的浓度中, 26.44mM 提供最精确的测定结果。

含试剂 3 的混合物组成也变化。例如, Tris 缓冲液被磷酸缓冲液取代且甘油加入缓冲液。磷酸盐在约 50mM 到约 500mM 范围的浓度, pH7.6 有效。甘油浓度范围从约 0.5%到 15.0% (v/v)。磷酸盐和甘油用于提供酶更长的半衰期, 这用 TRIS 缓冲液是不可能的。

本发明的一个优点是它可使用任何一些仪器。例如, 该测定适合在 2 种不同仪器 Hitachi 911 和 Beckman CX5 上测试。注意到用任一种机器获得精确和一致的结果。另外, 测定可仅用 2 种试剂进行, 通过在仪器要求基础上将 R1 和 R2 成分以正确比例混合。

最后, 本发明适用于单校准点。重要的是, 来自单校准点的结果和多点校准曲线一样精确。

附图的概述

图 1 描述了吸光度相对时间图, 用丙酮酸水溶液 (5-100 μ M) 获得, 证明丙酮酸的定量。试剂成分描述于表 1 且仪器设置描述于表 2。

图 2 描述了吸光度值相对已知量丙酮酸 (0-100 μ M) 作图的标准曲线。测定时间是 5 分钟;

图 3 描述了吸光度相对时间图, 用胱硫醚水溶液 (0-100 μ M) 获得。测量胱硫醚是通过 CBL 将胱硫醚酶促转变成高半胱氨酸、丙酮酸和氨。

图 4 描述了胱硫醚测定标准曲线, 用胱硫醚水溶液 (0-100 μ M) 获得。反应时间是 5 或 20 分钟;

图 5 描述了吸光度相对时间图, 证明 CBS/CBL/丙酮酸氧化酶/过氧化物酶循环和信号系统。胱硫醚溶解于水以制备 1 和 100 μ M 间的浓度标准;

图 6 描述了吸光度相对时间图, 证明 CBS/CBL/丙酮酸氧化酶/过氧化物酶循环和信号系统。高半胱氨酸溶解于水以制备 0 和 100 μ M 间的浓度标准;

图 7 描述了用高半胱氨酸水溶液 (0-100 μ M) 获得的典型校准曲线, 使用 CBS/CBL/PO/HRP 循环和检测系统;

图 8 描述了用高半胱氨酸水溶液 (0-100 μ M) 获得的典型吸光度相对时间图, 使用没有二硫苏糖醇的 CBS/CBL/LDH 系统;

图 9 描述了用高半胱氨酸水溶液 (0-100 μ M) 获得的典型吸光度相对时间图, 使用有二硫苏糖醇的 CBS/CBL/LDH 系统;

图 10 描述了有或没有二硫苏糖醇时高半胱氨酸浓度 (0-100 μ M) 相对吸光度的校准图。反应时间是 5 分钟;

图 11 描述了用 CBS/CBL/LDH 酶循环系统获得的定量结果间的相互关系, 系统用 DTT 作为还原剂测量人血浆样品中的高半胱氨酸, 与 Abbott IMx 高半胱氨酸方法所得定量结果相比较;

图 12 描述的相关图阐明本发明测定 (y) 相对商业购买 IMx 测定 (x) 间的相互关系, 如实施例 7 所述;

图 13 描述的相关图阐明本发明测定 (y) 相对常规 HPLC 测定 (x) 间的相互关系, 如实施例 7 所述;

图 14 描述的相关图阐明 IMx 测定 (x) 和 HPLC 测定 (y) 间的相互关系, 如实施例 7 所述;

图 15 描述了吸光度相对时间的图, 用于实施例 9 所述无 DTT 的丙酮酸测定。

图 16 描述了吸光度相对时间的图, 用于实施例 9 所述含 DTT 的丙酮酸测定。

特定实施方案的描述

本发明提供均相酶循环测定用于评估样品中的高半胱氨酸量。酶循环维持高半胱氨酸的稳态水平且进一步增加测试高半胱氨酸的敏感性。此外, 本发明提供基因和表达载体以重组产生用于本发明的酶。也提供测试试剂盒用于评估溶液中高半胱氨酸和/或胱硫醚的量。

高半胱氨酸在细胞中作为中间氨基酸存在, 在甲硫氨酸代谢成半胱氨酸时产生。一般, 体内产生的高半胱氨酸通过两条途径之一被迅速代谢: (1) 与丝氨酸缩合以形成胱硫醚或 (2) 转变成甲硫氨酸, 正常情况下其在体内的浓度 (以及它的氧化形式高半胱氨酸) 低。健康成人的平均血浆高半胱氨酸水平男性约为 12 μ M, 范围从约 8.6 到约 17.1 μ M, 女性为 10 μ M, 范围从约 3.9 到 16.8 μ M (Vester 等., *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.*, 29:549-554(1991); Jacobsen 等., *Clin. Chem.*, 40:873-881(1994))。

近来, 已确定生物样品中高半胱氨酸水平的量在一些情况中具有临床重要性。

血液中高半胱氨酸量增加与动脉硬化症的发展相关 (Clarke 等., *New Eng. J. Med.*, 324:1149- 1151(1991))。同样, 现在认为中等高半胱氨酸血症 (homocysteinemia) 是心血管病的危险因子。正常成人中发现的正常高半胱氨酸范围的精确性很重要, 因为已确定的心脏病危险显著增加, 仅超过正常浓度 30% 会使相关危险因子增加 3.4 倍 (Stampfer 等., *JAMA* 268:877-881(1992))。

如本文所用, 术语“评估”包括定量和定性确定测试溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量。如本文所用, “溶液”或“测试溶液”指临床或生物液体样品或组织提取物, 可包括例如血液、血液衍生物如血浆、或尿等。

酶 CBS 存在时, 含高半胱氨酸的样品与 L-丝氨酸反应以形成胱硫醚。胱硫醚然后可用第 2 种酶 CBL 转变成高半胱氨酸、丙酮酸和氨。同时用这些合成代谢和分解代谢酶操作的结果是“无效循环”, 其中 (1) 胱硫醚和高半胱氨酸连续互变, (2) 丝氨酸被降解以及 (3) 产生丙酮酸和氨。

与高半胱氨酸相比, 使用相对高浓度的丝氨酸提供有助于总反应速度的条件, 总反应速度遵循准一级动力学, 直接取决于反应中高半胱氨酸和胱硫醚的量。如果胱硫醚浓度与高半胱氨酸浓度相比低许多, 总反应速度会随着高半胱氨酸量而线性变化。通过测量丝氨酸减少或者丙酮酸或氨的增加, 未知溶液或样品中高半胱氨酸的量可通过与对照反应进行相同酶反应比较来确定, 对照反应包括已知浓度的高半胱氨酸。本发明的酶促循环方法提供扩增过程, 产生的最终产物量远大于测试溶液即血液中可能的高半胱氨酸量。因此, 确定反应产生的丙酮酸或氨量的测定不必须很敏感且可通过技术人员已知的现有方法测量。

丙酮酸通常通过酶转变成乳酸来测量, 用乳酸脱氢酶或其衍生物。此酶促转变反应需要辅因子 NADH (还原的烟酰胺辅因子) 或其衍生物, NADH 转变为 NAD⁺ (氧化的烟酰胺辅因子)。通过测量 340nm 的吸光度可监控反应。如本文所用, 关于辅因子的术语“衍生物”指盐、溶剂化物和其它化学修饰形式, 这些形式保持整体辅因子活性, 但在水溶液中稳定性扩展。衍生物可包括但不限于 NADH 的乙酰衍生物, 包括 3-吡啶醛-NADH、3-乙酰吡啶-NADH、3-硫代烟酰胺-NADH 等 (参见例如美国专利 5,801,006)。

其它确定 NADH 或其衍生物氧化的简便测定包括例如荧光测量, 如 Passoneau 等., 《酶促分析, 实践指南》(*Enzymatic Analysis, A Practical Guide*), 219-222 页(1993)所述 (纳入本文供参考)。在另一个实施方案中, NADH 或其衍生物在乳酸脱氢酶存在时与丙酮酸反应以形成 NAD⁺, 氧化时 NAD⁺进一步与能产生颜色变化的

染料反应,优选在可见范围。染料的颜色变化可用于确定 NADH 氧化成 NAD⁺的总量,与酶促循环反应形成的丙酮酸量相符合。可用于本发明的染料例子包括但不限于 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)、2,6-二氯苯醌酚、四唑氮化合物、吩嗪硫酸甲酯、甲基紫精或各自的衍生物。

丙酮酸也可在用丙酮酸氧化酶或其衍生物的反应中测量,存在过氧化物酶即辣奶过氧化物酶等。例如通过氧化缩合水溶性氢供体确定转变成过氧化氢的丙酮酸量,此供体提供有色化合物用于光度测定过氧化物浓度。特别优选的氢供体提供稳定的颜色反应产物,包括 N-烷基-N-磺丙基苯胺衍生物的水溶性衍生物,即 N-乙基-N-(2-羟基 3-磺丙基)-m-甲苯胺(TOOS)的钠盐(Tamaoku 等., *Chem. Pharm. Bull.* 30: 2492- 2497(1982))。H₂O₂ 的量也可电势测量。这包括安培计和电位计测量。测定高半胱氨酸和/或胱硫醚的量由过氧化物量的相关性确定,过氧化物通过丙酮酸氧化酶在规定时间段从丙酮酸转化产生。

氨也可用不同方法测量,包括使用氨传感器(Willems 等., *Clin. Chem.* 34:2372 (1988))。氨也可用已知比色技术检测。例如,样品中产生的氨能反应形成有色产物,形成可分光光度检测的产物。纳入本文供参考的《酶促分析方法》(*Methods of Enzymatic Analysis*) (Bergmeyer) 1:1049-1056 (1970)所述方法取决于次氯酸盐存在时氨与苯酚在碱性条件反应形成有色染料醌酚。硝普钠可用作催化剂。也可使用修改的方法,例如使用多种衍生物。有色最终产物形成的量与氨浓度成正比,因而与高半胱氨酸成正比。其它方法可包括例如微扩散分析(Seligson 等., *J. Lab. Clin. Med.*, . 49:962-974 (1957))、阴离子交换技术(Forman, *Clin. Chem.* 10:497-508(1964))和多种酶方法(参见例如 Mondzac 等., *J. Lab. Clin. Med.*, . 66:526-531(1979))。

评估高半胱氨酸和/或胱硫醚量的酶促循环方法减少其它先前测定法中的困难,其中背景化合物和背景反应产生“噪音”。在本发明测定中,可加入大量廉价氨基酸如 L-丝氨酸以使 L-丝氨酸全转变成丙酮酸和氨。在较佳实施方案中,可使用 250 μM 或更高的丝氨酸浓度,随后转变成丙酮酸和氨。血浆通常含约 100 μM 丝氨酸。此内源丝氨酸的量对于本测定不重要,因为该测定测量转变的速度受高半胱氨酸量的限制而不是丝氨酸量的限制。不预期约 0.1mM 到 10mM 的 L-丝氨酸浓度影响所示测定的敏感性或精确性。

此外,本发明酶促循环方法提供的 L-丝氨酸转化的速度取决于准一级反应中的高半胱氨酸浓度。正常血液丙酮酸水平通常在约 0.4 和 2.5mg/100ml 间

(Lehninger, AL. 《生化原理》(Principles of Biochemistry). 1982. Worthington Publishers, Inc. 707 页, 纳入本文供参考), 与约 45-284 μM 相符合。此丙酮酸浓度可提供较小背景测量, 但本测定测量随着时间的变化并能方便调节用于溶液中起始水平的丙酮酸。另外, 丙酮酸可在乳酸脱氢酶或其它酶温育前去除。更重要的是, 半胱氨酸和其它携带硫的化合物如血液不显著有助于酶促循环反应, 因此被认为是系统中不重要的噪音。

在本发明的另一个实施方案中, 可处理样品以去除胱硫醚提高高半胱氨酸测量的精确性。作为一个特定例子, 处理包括胱硫醚 γ -裂合酶接触溶液使胱硫醚转变成 α -酮戊二酸(不参与上述酶促循环的化合物)。进行酶促循环测定以评估高半胱氨酸量前, 胱硫醚 γ -裂合酶必须从样品中去除或破坏, 即通过热等。

发明的此特定实施方案也可用于评估胱硫醚的量, 通过在进行酶促循环测定前比较胱硫醚 γ -裂合酶处理和未处理样品中丙酮酸和/或氨的产生速度的差异。因此, 本发明可用于确定未知样品中胱硫醚的量, 即使样品包含高半胱氨酸。

在一些生物样品如血液中, 高半胱氨酸通常经二硫键结合蛋白质、硫醇和其它细胞成分。一般, 处理样品可用还原剂如硼氢化钠或硼氢化钾; 硫醇如二硫赤藓糖醇、 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇、巯基乙酸或谷胱甘肽; 或者磷化氢或三烷基磷化氢如三丁基磷化氢和 tris(2-羧乙基)磷化氢(TCEP)等, 以释放结合和二硫键连接的高半胱氨酸。先前测定法需要抗体用于检测步骤, 必须改变反应混合物的氧化还原条件(大部分抗体用二硫键结合)。然而, 本方法中不需要洗涤或改变氧化还原条件, 因为所用 CBS 和 CBL 在还原条件下具有活性。因此, 本发明测定所需步骤少于许多现有技术的免疫测定。

在一个典型实施方案中, 样品包括血液、血液部分、血清、血浆或尿, 用还原剂处理且直接测定高半胱氨酸。也优选在测定前加热样品, 用于加速释放高半胱氨酸并使降解酶和其它可干扰测定的因子失活。用于高半胱氨酸测定的血液样品的一般处理对于其它方法领域的技术人员已知, 其它方法如 HPLC 测试。

CBS 和 CBL 是自然界中常见的酶。人和酵母使用 CBS 合成甲硫氨酸; CBS 的人 cDNA 可取代啤酒酵母中的 CBS 基因(Kruger 等., *Hum. Molec. Genet.*, 4:1155-1161 (1995))。CBL 在许多细菌中发现, 包括大肠杆菌(Laber 等., *FEBS Lett.*, 379:94-96 (1996))。CBS 和 CBL 基因的完整 DNA 序列在这些生物体和其它种类中已知, 为给熟练的分子生物学家提供了易克隆或合成这些基因或其衍生物的来源。

如本文所用, 关于酶的“衍生物”指通过氨基酸加入、缺失、取代和/或修饰

产生的突变体；通过重组和/或 DNA 改组产生的突变体；盐、溶剂化物和酶的其他化学修饰形式，修饰形式保持分离的天然酶的酶活性。通过 DNA 改组产生用于本发明的衍生酶的方法描述于美国专利 5,605,793（纳入本文供参考）。即使没有克隆，两种酶从一些不同生物体中纯化。参见例如 Ono 等., *Yeast.*, 10:333-339(1994); Dwivedi 等., *Biochemistry* 21:3064-3069(1982), 纳入本文供参考。在本发明的一个较佳实施方案中，提供遗传修饰的生物体以产生 CBS 或其衍生物和产生 CBL 或其衍生物，它们可用于酶促循环测定以提供成本降低的试剂且纯化酶更容易。

类似地，关于核苷酸序列的术语“衍生物”指通过核苷酸加入、缺失、取代和/或修饰和/或组合化学产生的变体和突变体；通过重组和/或 DNA 改组产生的突变体；盐、溶剂化物和序列的其他化学修饰形式，修饰形式保持所需序列的活性如 MetR 的结合特性。当使用修饰的衍生序列时，序列优选与原始序列有至少约 60% 的序列同一性。此同一性更优选为至少约 70%，更加优选为至少约 85%。这些序列最优选与原始序列有至少约 95% 的序列同一性。

CBS 基因和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的完整基因组已被测序。同样，CBL 基因和大肠杆菌的剩余基因也已知。因此，使用分子生物领域的普通技术，编码 CBS 和 CBL 的基因可在两种生物体中克隆和表达。已知纯化两种酶的表达方法，使用标准蛋白质纯化方法。然而各酶可构建作为融合蛋白，包括例如协助活性酶溶解和/或重折叠的另一种蛋白质部分或可加入协助纯化的氨基酸序列。加入用于纯化的氨基酸序列例子包括亲和标记如聚-His，或可加入谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 以在单个亲和柱上更迅速纯化蛋白质。尽管酶不需要纯化均匀用于本发明的诊断测试，蛋白酶和其他使丝氨酸转变成丙酮酸的活性可通过纯化降低到不重要水平。

此外，酶浓度一般在反应期间和长期保存时产生稳定性较高的酶活性。CBS 和 CBL 来自除了酿酒酵母和大肠杆菌外的生物体，特别是嗜热生物，预期是具更高稳定性的酶来源。也可选择与高半胱氨酸亲和性较高的分离酶。另外，酵母 CBS 和细菌 CBL 的蛋白质工程可产生商业性质改进的酶，包括较高亲和性、较快反应速度、较易纯化和保存时较长的半衰期。

类似地，胱硫醚 γ -裂合酶 (CGL) 在许多种类中详细描述（参见例如 Yamagata 等., *J. Bacteriol.*, 175:4800-4808(1993), 纳入本文供参考）。操作编码 CGL 的基因可通过标准重组方法进一步遗传修饰并插入宿主细胞以开发较高水平的生产

菌株。

重组表达 CBS、CBL 和 CGL 基因是典型的。这些方法可提供大量纯化酶且基因可被修饰，例如加入特定肽序列（亲和标记）以表达能用于亲和纯化的酶。通过在重组酶表达中使用亲和标记，可大大简化这些酶的纯化和固定，降低成本。亲和标记在本领域已知，包括但不限于如聚-组氨酸、GST（谷胱甘肽-S-转移酶）、p-标记、“标志”、c-myc 序列等。标记广泛用于亲和纯化重组表达的蛋白质，许多可商业购买。

在一个较佳实施方案中，CBS 和 CBL 固定于固体表面，以维持酶活性和保持高半胱氨酸不直接与蛋白质相互作用的方式。通过高密度固定酶，不同蛋白质间的扩散距离相对溶液中的酶减少。结果，测定的总反应速度大大增加，因为一种酶的产物与另一种酶反应且反之亦然。加速反应速度是由于中间物浓度的局部提高，固定使中间物与下一个酶更接近。增加高半胱氨酸测定速度可以是诊断产品市场性的重要因素，因为 CBS 和 CBL 的 K_m 在毫摩尔范围中，但高半胱氨酸的血液浓度约为 $10 \mu M$ 。已知扩散-限制反应需要高浓度的酶以提供快速的反应速度。在循环测定中固定酶克服这两种酶对它们各自底物低亲和性可能产生的困难。

在另一个较佳实施方案中，CBS 和 CBL 固定作为融合蛋白。两种不同蛋白质彼此的距离和方向可在融合基因表达载体的构建中控制。通过使两种活性适当位于融合蛋白中，高半胱氨酸和胱硫醚互变能在蛋白质内很迅速发生，因为扩散距离可在两个活性中心间最小化。因此，高半胱氨酸在整体酶促循环反应中表现像辅因子，从 L-丝氨酸产生丙酮酸和氨。

本发明的酶促循环测定可以一些测定模式提供。最简单的测定模式提供的试剂溶液包括 L-丝氨酸、CBS 或其衍生物、CBL 或其衍生物、最优化酶反应所需的多种缓冲液和辅助物质。在本发明的一个特别较佳实施方案中，CBS 或其衍生物、CBL 或其衍生物固定于固体表面。

酶固定于固体表面同时保持大体上所有酶活性在本领域熟知。用于固定的一些方法包括共价结合、物理吸收、截留和电化学沉积。作为一个例子，戊二醛用于固定肌酸酐脱氨酶和谷氨酸氧化酶到丙胺衍生控制的孔玻璃珠（Rui 等., *Ann. NY Acad. Sci.*, 672:264-271(1992)）。其它例子包括但不限于用碳二亚胺使酶共价附于琥珀酸衍生玻璃珠（Rui 等., 同上）、用异或同-双功能交联试剂（如 SPDP、N-琥珀酰亚胺基 3-(2-二硫代吡啶)丙酸盐；SMPT、琥珀酰亚胺氧羰基- α -甲基- α -(2-二硫代吡啶)-甲苯；DSP、二硫双(琥珀酰亚胺基丙酸盐)

(succinimidylpropionate); DTSSP、3,3'-二硫双(磺基-琥珀酰亚胺基丙酸盐); DSS、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯等)使酶通过例如氨或巯基共价附于衍生固体表面 (Wilson 等., *Biosens. Bioe lectro.*, 11:805-810(1996))。

如本文所用,“固体表面”可包括多孔或非多孔水不溶性物质,能具有任何形状如条、杆状颗粒,包括珠等。合适材料在本领域熟知且可包括例如纸、滤纸、尼龙、玻璃、陶瓷、硅石、氧化铝、硅藻土、纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚氯乙烯和它们各自的衍生物。固体表面可以是测试容器的侧面和底部或可以是加入测试容器的物质。在一个较佳实施方案中,固体表面包括加入测试容器的珠。

酵母和细菌都具有将 L-丝氨酸转变成丙酮酸的酶,活性有时称为丝氨酸脱氨酶或丝氨酸脱水酶。很好确立的突变方法可用于大幅降低或除去这些活性,活性可显著地产生高半胱氨酸测定中的背景。尤其是可遗传操作酿酒酵母以去除丝氨酸脱氨酶活性,此活性对于(1)异亮氨酸合成和(2)以丝氨酸作为碳或氮源生长是必需的,使用称为“基因破坏”的简单方法。通过缺失酵母 *chal* 基因去除主要的丝氨酸脱氨酶活性,从而去除循环测定的一个潜在背景问题。此外,*chal* 缺失可用于选择 CBS-CBL 融合蛋白并用于遗传改造这些融合蛋白。*chal* 缺失菌株不能以丝氨酸作为唯一碳或氮源生长。CBS-CBL 融合基因能互补缺失,只要有高半胱氨酸作为“辅因子”,因为循环系统产生的最终结果与丝氨酸脱氨酶相同。因此,*chal* 缺失可用于选择和维持改进的 CBS-CBL 融合,特别是如果融合基因群被突变并置于单拷贝载体或酵母染色体上。在丝氨酸培养基上生长较快或高半胱氨酸需求减少的细胞可包含的突变编码较快速酶或对高半胱氨酸和胱硫醚亲和性较高的蛋白质。

本发明也提供另外方法评估样品中高半胱氨酸的量,使用代谢物结合转录因子。当代谢物结合转录因子结合它们各自的代谢物时,因子复合体结合特异受体多核苷酸序列。可监控转录因子复合体结合其受体共有序列并与样品中存在的代谢物量相关。

本领域已知的一些转录因子与小分子或代谢物相联时,结合特异 DNA 结合位置。例如,大肠杆菌有操纵子调节元件,转录因子 MetR 调节响应于结合高半胱氨酸的 Met 操纵子 (Cai 等., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163:79-83(1989))。MetR 或其衍生物调节基因如 MetE (不依赖 cobolamin 的甲硫氨酸合酶)、MetH (依赖 cobolamin 的甲硫氨酸合酶) 和 GlyA (丝氨酸氢化酶)。MetR 和其衍生物优选

在高半胱氨酸存在时结合其共有 DNA 序列且缺乏高半胱氨酸时不存在于细胞胞质中。高半胱氨酸存在时结合 MetR 可用于评估怀疑含高半胱氨酸的样品中高半胱氨酸的量。

在发明的一个特定实施方案中，测定包括多核苷酸序列编码固定于固体支持物的 MetR 受体多核苷酸的共有序列，固定的方式能接近共有受体序列以结合 MetR。核苷酸可以是例如：

GTTAATGTTGAACAAATCTCATGTTGCGTG (SEQ ID NO:11)

处理样品如血浆、血液或尿以在样品混合试剂溶液前释放任何结合蛋白质的高半胱氨酸，溶液包括缓冲剂中的 MetR，存在固定共有受体序列时，在有助于形成复合体的条件下。温育阶段后，洗涤固体支持物以去除未结合试剂且评估保持结合固体支持物的 MetR 量。确定保持结合固体表面的 MetR 量通常可以是 ELISA、表面胞质基因组共振即 BIACORE 或简单的标准蛋白质测定，此量与样品中存在的高半胱氨酸量相关。

处理样品以释放高半胱氨酸可用还原剂完成。上述一些试剂在本领域熟知。通常样品混合含足够量还原剂的缓冲溶液以从样品中存在的任何相关蛋白质中释放大体上所有高半胱氨酸。普遍使用的还原剂包括但不限于硼氢化钠和硼氢化钾、 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、巯基乙酸或谷胱甘肽；或者磷或三烷基磷，如三丁基磷和 tris(2-羧乙基) 磷(TCEP)等。

也可修饰 MetR 蛋白质以掺合可检测标记，如生色团、荧光团等，以改进测定的速度和敏感性。加入可检测标记能减少进行测定所需时间段，这是通过去除一些样品处理步骤，例如另外的洗涤步骤。掺合的荧光团发出波长被寡核苷酸吸收到共有结合序列的光，能测量荧光能量转移以定量蛋白与共有序列的结合。可用于测量荧光转移的方法包括例如荧光共振能量转移 (FRET) 或邻近闪烁测定。通过在结合结构域中加入另外可检测标记对 MetR 结合共有序列另外修饰也可改进测定的特异性。

此外，确定肽序列（亲和标记）可加入 MetR 蛋白质以协助纯化和检测。亲和标记在本领域已知且包括但不限于例如聚-组氨酸、strep-标记、“标志”、c-myc 序列等。标记广泛用于亲和纯化重组表达的蛋白质，许多可商业购买。另外，改进重组表达 MetR 的结合亲和性的突变改变可用于提供其它的测定试剂。

在本发明的一个单独实施方案中，样品中高半胱氨酸的量可通过样品中高半胱氨酸的酶利用来确定。细胞代谢中高半胱氨酸转化通常从高半胱氨酸的巯基残基

中释放质子。释放此质子用于测量高半胱氨酸对大肠杆菌 cobolamin 依赖的甲硫氨酸合酶的结合亲和性 (Jerret 等., *Biochemistry*, 36:15739-15748(1997))。蛋白质如甲硫氨酸合酶催化的酶反应一般需要辅因子或另外的底物已完成反应。如果这些辅因子和底物不存在, 高半胱氨酸仍结合酶。在本方法中, 测量释放的质子去除酶反应释放的质子, 推动反应趋向消耗样品中存在的高半胱氨酸。测量与释放质子相关的 pH 变化确定样品中高半胱氨酸的量。例如在一个较佳实施方案中, 不依赖 cobolamin 的甲硫氨酸合酶可用于测定。

为方便起见, 本发明所用试剂可在用于测定方法的测试试剂盒中提供。典型试剂盒包括容纳测试溶液的小型组合容器、L-丝氨酸、CBS 或其衍生物、CBL 或其衍生物、最佳反应条件所需的辅助缓冲液和物质。重要的是, 多种防腐剂和/或稳定剂也能包括在任何/所有试剂盒试剂和/或酶中以延长半衰期以及样品测定的“联机”寿命。试剂盒可进一步包括还原剂或 CGL 以在循环测定前预处理样品。此外, 试剂盒可包括乳酸脱氢酶、NADH 和氧化时能观察到颜色改变的染料。

在合适情况下, 试剂盒中一种或多种试剂可在溶液中提供(有或没有防腐剂和/或稳定剂)或作为干粉, 通常冻干, 包括赋形剂、防腐剂和/或稳定剂, 溶解时可提供具合适浓度的试剂溶液以根据本发明进行测定。为提高发明的多功能性, 试剂可在相同或不同容器中以小型组合提供, 从而提供显著最优化方法和测定的试剂比例。试剂可各自在不同容器中或多种试剂能在一个或多个容器中结合, 这取决于试剂的稳定性。为方便起见, 本发明测定方法所用试剂可以预定量提供。测试试剂盒也能包含书面说明, 指导如何使用试剂和/或如何进行特定测定, 例如以包装插入物形式。

提供以下例子用于阐述, 而不用于限制。

实施例 1

大肠杆菌胱硫醚 β -裂合酶基因的克隆和表达

在此例子中, 使用标准 PCR 过程克隆大肠杆菌 CBL 基因。分离基因插入具亲和标记序列 (6HIS) 的表达载体中, 表达蛋白用亲和柱纯化。宿主细胞中大量 CBL 酶活性用表达载体构建物转化, 从细胞裂解物中纯化。

大肠杆菌胱硫醚 β -裂合酶 (CBL, EC 4.4.1.8) 基因的克隆

标准 PCR 过程使用扩展高保真 PCR 系统 (Roche Biochemicals), 用于扩增大肠杆菌 CBL 基因, 用 ONE SHOT TOP10 感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen) 作为基

基因组 DNA 来源。用于 CBL 克隆的 PCR 引物序列如下：(CBL N-末端引物：5'-CGACGGATCCGATGGCGGACAAAAAGCTTG-3'; SEQ ID NO:1) 和 (CBL C-末端引物：5'-CGCAGCAGCTGTTATACAATTCGCGCAAA-3'; SEQ ID NO:2)。PCR 扩增的 CBL 基因产物然后通过琼脂糖凝胶电泳纯化，用 BamHI 和 PvuII 限制性内切酶消化，再次通过琼脂糖凝胶电泳纯化。然后纯化的大肠杆菌 CBL 基因连接入凝胶纯化、BamHI/PvuII 消化的 pRSETB 蛋白质表达载体 (Invitrogen)。所得构建物提供 T7 转录启动子控制下的 CBL 基因，与氨基末端 6 个组氨酸 (6HIS) 残基前导序列 (后称为 6HISCBL) 框内克隆，可方便表达、亲和纯化和免疫染色分析来自大肠杆菌细胞的重组 6HISCBL 蛋白。列出大肠杆菌胱硫醚 β -裂合酶 (CBL) 基因的 DNA 序列 (SEQ ID NO:21)。也列出克隆的大肠杆菌胱硫醚 β -裂合酶 (CBL) 蛋白质序列 (SEQ ID NO:19)，它具有氨基-(NH₃)-末端 6 个组氨酸 (6HIS) 亲和标记，由 CBL 基因克隆入 pRSETB 细菌表达质粒产生。

胱硫醚 β -裂合酶蛋白表达和纯化

pRSETB (6HISCBL) 质粒构建物转化入 BL21(DE3)pLysS 大肠杆菌菌株 (Invitrogen)，在 LB/琼脂平板上涂布，平板含 (100 μ g/ml 氨苄青霉素、35 μ g/ml 氯霉素)，然后 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。然后转移单细菌菌落并在含 100ml LB 生长培养基的烧瓶中生长过夜，培养基含氨苄青霉素和氯霉素。然后 100ml 过夜培养物加入多个含 1L 新鲜 LB 生长培养基的烧瓶，培养基含氨苄青霉素，使培养物生长直到 A₆₀₀ 为 0.6 (约 2.5 小时)。为诱导 CBL 蛋白表达 (由 T7 启动子驱动)，异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 然后加入生长培养基至 0.1 到 1mM 终浓度。CBL 酶辅因子吡哆醛 5'-磷酸 (PLP) 也在诱导中加入生长培养基至 100 μ M 终浓度。监控细胞生长和 6HISCBL 蛋白表达 5 小时后，大肠杆菌细胞通过离心收集、重悬浮、在无 EDTA 的完整蛋白酶抑制剂 (Roche Biochemicals) 存在时加入 BUGBUSTER 蛋白质提取试剂 (Novagen Inc.) 来裂解，如厂商规程所述。然后细胞裂解物用 DNase I 处理，通过离心澄清并上样到亲和柱，柱含聚-His 蛋白质纯化树脂 (Roche Biochemicals)。然后柱用 10 床体积的平衡缓冲液 (50mM KPi, pH7.8、0.5M NaCl) 洗涤，接着用 5 床体积的洗脱缓冲液 1 (50mM KPi, pH7.8、0.5M NaCl、10mM 咪唑; EB1)、5 床体积的洗脱缓冲液 2 (50mM KPi, pH7.8、0.5M NaCl、50mM 咪唑; EB2) 和 5 床体积的洗脱缓冲液 3 (50mM KPi, pH7.8、0.5M NaCl、500mM 咪唑; EB3) 洗脱。然后纯化过程各步骤中所取样品通过变性蛋白凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析并用考马斯亮蓝染色或用缀合小鼠免疫球蛋白的单克隆抗聚组氨酸过氧化物酶进行

蛋白质印迹分析检测，如厂商所述 (Sigma)。

发现纯化 6HISCBL 蛋白主要在洗脱缓冲液 2 和 3 (EB2 和 EB3) 中洗脱。含 CBL 的洗脱物然后用离心过滤室 (Amicon) 浓缩且在 4°C 对贮存缓冲液 (50mM TrisHCl, pH8、100mM NaCl、5mM PLP) 透析过夜，等分并在 -80°C 冷冻保存。然后纯化均一的 CBL 酶浓度在 280nm 消光系数和 43,312 Da 亚基重量的基础上计算 (Clausen 等. *Biochem.* 36:12633-42 (1997))。纯化 6HISCBL 的典型产量在 20-30mg 6HISCBL 每克大肠杆菌细胞团范围中。

CBL 活性测定

从 pRSETB (6HISCBL) 质粒构建物表达的亲和纯化重组 6HisCBL 蛋白的 CBL 活性如前所述进行 (Clausen 等. *Biochem.* 36:12633-42 (1997)，纳入本文供参考)。简单地，测定混合物在 1mL 的终反应体积中含 100mM Tris/HCl (pH8.5)、5mM L-胱硫醚、1 mM 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) (DNTB; Ellman 试剂) 和 6HisCBL 酶。反应后记录 412nm 吸光度随着时间的增加。相同酶反应也在具已知底物浓度的样品上进行以产生标准曲线。完整细胞裂解物中检测到的大体上所有 CBL 活性被恢复并发现存在于重组 6HisCBL 酶的实验纯化样品中，酶产生自 pRSETB (6HisCBL) 质粒构建物。

实施例 2

酵母胱硫醚 β-合酶 (CBS) 基因在酵母中的克隆和表达

在此例子中，PCR 方法用于从酵母中克隆 CBS 基因。含 CBS 基因的 PCR 片段插入有和没有亲和标记的表达载体，标记加入有助于表达基因产物的纯化。

酿酒酵母的实验室菌株 (5153-11-1(his3 met2)) 用作 CBS 基因来源。细胞在 YEPD 上 32°C 生长，离心，用水洗涤并转移到 200 μl 酵母质粒缓冲液 (100mM NaCl、10mM Tris(pH8)、1mM EDTA、0.2% SDS) 中。细胞悬浮液与等体积的 0.45mm 玻璃珠混合并以高速涡旋 3x30 秒。液体通过移液管除去且在 microfuge 中离心 2 分钟以去除细胞碎片。上清用 PCI (酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)) 和氯仿提取。加入氯化钠 (5M) (约 20 μl)，DNA 用等体积异丙醇沉淀。

此基因组酵母 DNA 通过 PCR 用引物 CI-001 (CGGGGATCCTGATGCATGCAT GATAAGGA; SEQ ID NO:3) 和 CI-012 (CGGCATTACCGTTTCACTAATTTATTG; SEQ ID NO:4) 扩增，引物是发表的酵母 CBS 结构基因侧翼核苷酸序列。引物 CI-001 (SEQ ID NO:3) 包含在 CBS 基因的非翻译 3' 侧上发现的 BamHI 位点。为将 BamHI

序列加入 PCR 片段的 5'侧，基因进一步通过 PCR 用 CI-001 (SEQ ID NO:3) 和 CI-002 (GTTGGATCCGGCATTACCGTTTCAC; SEQ ID NO:5) 扩增。所得 PCR 产物是约 1937 个碱基对的 DNA 序列，包括 1512 个编码 CBS 蛋白的碱基对。在编码序列侧翼的另外 DNA 包括酵母 CBS 基因的天然启动子和转录终止序列。

一个强启动子插入 CBS 基因上游以促进蛋白质高水平表达。酵母 TPI1 启动子在标准 PCR 反应中从相同基因组酵母 DNA 克隆，使用引物 CI-009 (GGTGGATCCATCAATAGATACGTA CGTCCT; SEQ ID NO:6) 和 CI-010 (TTTTAGTTTATGTATGTGTTTTTTG; SEQ ID NO:7)。为使 CBS 编码区附于 TPI1 启动子，使用衔接引物：CI-011 (AACACATACATAAACTAAAAATGACTAAATCTGAGCAGCAA; SEQ ID NO:8)，它包含 TPI1 启动子的 20 个碱基和 CBS 基因的前 21 个碱基。上面获得的 CBS 序列通过 PCR 用引物 CI-001 (SEQ ID NO:3) 和 CI-011 (SEQ ID NO:8) 扩增。所得 PCR 产物与来自上面的 TPI1 启动子产物混合，混合物通过 PCR 用引物 CI-001 (SEQ ID NO:3) 和 CI-009 (SEQ ID NO:6) 扩增以产生命名为“TPICBS”的融合基因，基因包括 TPI1 启动子、CBS 编码序列和 CBS 转录终止子。

CBS 和 TPICBS PCR 产物各自在编码区的 5'和 3'侧包括 BamHI 位点。这些 PCR 产物用 PCR WIZARD PREP (Promega) 根据厂商建议纯化，用 BamHI 切割。所得 BamHI 核苷酸片段在 1%琼脂糖 TBE 凝胶上跑并用 NA45 纸 (S&S) 纯化。酵母、大肠杆菌穿梭载体 C1-1 在四环素抗性基因中具有独特 BamHI 位点，用于表达 CBS 基因。C1-1 载体用 BamHI 切割并根据厂商说明 (Roche Biochemicals) 用虾碱性磷酸酶处理。CBS 和 TPICBS BamHI 片段连接入线性化 C1-1 载体。连接反应转化到 TOP10 细胞 (Invitrogen) 中，细胞在 LB 氨苄青霉素板上平板培养。抗氨苄青霉素的转化子转移到 LB amp 和 LB tet 平板以确定四环素敏感克隆。从 LB amp 平板选择一些 tet-敏感菌落，在 LB amp 平板上生长过夜，通过质粒 DNA 的碱裂解法进一步加工。DNA 用 BamHI 切割并在 1%琼脂糖胶上分离以确定哪个质粒含 CBS 或 TPICBS 插入物。

携带插入物的 C1-1 质粒转化到酵母菌株 INVSc-1 中，它是可从 Invitrogen 公司购买的二倍体菌株。INVSc-1 在 LEU2 基因的 2 个拷贝中都有突变且需要来自 C1-1 质粒的 LEU2 基因以在无亮氨酸的培养基上选择性生长。INVSc-1 用 C1-1 相关质粒转化，根据厂商说明使用 Invitrogen 的酵母转化试剂盒。此试剂盒包括用消解酶产生细胞的原生质球，接着钙处理用于 DNA 转化。转化子在合成培养基上平板培

养，培养基含 1M 山梨糖醇、酵母氮基础组分和酵母补充物，除了亮氨酸。32℃ 培养 3 天后，转化子在覆盖琼脂中可见。

聚-组氨酸附于胱硫醚 β-合酶用于酵母表达

编码 6 个组氨酸的 DNA 序列在 CBS 和 TPICBS 载体构建物中加入 CBS 编码区的 3' 末端。通过用引物 CI-017 (ATGATGATGATGATGATGACCTGCT AAGTAGCT CAGTAA; SEQ ID NO:9) 扩增来自上面的 CBS PCR 片段，聚组氨酸的编码序列加入原始 CBS 克隆。所得 PCR 产物包括天然 CBS 启动子区、CBS 编码区以及进一步的甘氨酸和 6 个组氨酸残基编码序列。加入甘氨酸残基以增加翻译后聚-his 肽的空间灵活性。聚-his CBS PCR 产物从原始 CBS DNA 胶纯化，其后用引物 CI-002 (SEQ ID NO:5) 和 CI-017 (SEQ ID NO:9) 连续 2 次 PCR 扩增以实际上去除原始 CBS DNA。

类似地，来自上面的 TPICBS PCR 产物用引物 CI-009 (SEQ ID NO:6) 和 CI-017 (SEQ ID NO:9) 扩增。PCR 产物是凝胶纯化，并用 CI-009 (SEQ ID NO:6) 和 CI-017 (SEQ ID NO:9) 重扩增 2 次以大幅减少输入 TPICBS DNA 序列。

CBS 基因也通过 PCR 用引物 CI-001 (SEQ ID NO:3) 和 CI-018 (CATCATCATCATCATTAATAAGAACCCACGCT; SEQ ID NO:10) 扩增以产生具 TAA 终止密码子的聚-组氨酸序列，接着是转录终止序列。此约 190bp 的短 PCR 产物 (“终止子”) 也是凝胶纯化并通过 PCR 用相同引物克隆。聚-his CBS 和 “终止子” 片断结合在一个 PCR 反应中，使用引物 CI-001 (SEQ ID NO:3) 和 CI-002 (SEQ ID NO:5)。所得扩增产生名为 “CBSH” 的核酸分子，包括天然 CBS 启动子、完整 CBS 编码区、一个另外的甘氨酸残基、具终止密码子的 6 个组氨酸残基以及 CBS 转录终止子。

同样，聚-his TPICBS 和终止子片断结合在一个 PCR 反应中，使用引物 CI-001 (SEQ ID NO:3) 和 CI-009 (SEQ ID NO:6)。所得名为 “TPICBSH” 的核酸产物与 CBSH 序列相同，除了 TPI1 启动子取代天然 CBS 启动子。CBSH 和 TPICBSH (各包含聚-组氨酸亲和标记序列) 用 BamHI 切割并连接入 C1-1，如以上适合于 CBS 和 TPICBS 序列。连接混合物转化入 INVSc-1。Tet-敏感菌落通过限制性酶分析检测适当的克隆基因插入 C1-1 中。

实施例 3

酵母胱硫醚 β-合酶 (CBS) 基因在大肠杆菌中的克隆、表达和纯化

在此例子中，标准 PCR 和分子生物学技术用于克隆酿酒酵母（INVSc1）胱硫醚 β -合酶（CBS）基因作为具氨基-末端谷胱甘肽-S-转移酶（GST）的融合蛋白。加入此谷胱甘肽-S-转移酶区域可从大肠杆菌培养基中单步亲和纯化 CBS 蛋白，也能协助活性形式酶的溶解和/或促进适当重折叠。

克隆

酿酒酵母的实验室菌株（INVSc1）（Invitrogen）用作 CBS 基因来源。INVSc1 酵母单菌落在 100 μ l 去离子水中煮沸 5 分钟，在等体积 0.45mm 玻璃珠存在时迅速涡旋 2 分钟。1 微升此细胞裂解物然后用作酵母 CBS 基因的 PCR 扩增的 DNA 来源，使用引物 CI-024（GCGGGTCGACTATGACTAAATCTGAGCAGCAAGCC；SEQ ID NO:12）和 CI-025（GCGTGCGGCCGCGTTATGCTAAGTAGCTCAG；SEQ ID NO:13），引物包含发表 CBS 基因的侧翼序列和克隆到 pGEX-6P-2（Amersham Pharmacia）表达载体的限制性位点。所得 PCR 产物（约 1548bp）然后通过琼脂糖凝胶分离和纯化，DNA 提取用商业试剂盒（Roche）。纯化 PCR 产物所含 CBS 基因侧翼有 SalI（5'末端）和 NotI（3'末端）限制性酶位点，然后被消化（通过 SalI 和 NotI）、凝胶纯化、连接入 pGEX-6P-2 表达载体（Amersham Pharmacia）。限制性酶图谱用于确认 PCR 扩增的 DNA 作为酵母 CBS 基因的同源性。描述了克隆酿酒酵母胱硫醚 β -合酶（CBS）基因的 DNA 序列（SEQ ID NO:14）。也描述了克隆酿酒酵母 CBS 的蛋白质序列（SEQ ID NO:20），此序列由于克隆到细菌表达载体 pGEX-6P-2 的结果附着具有氨基-(NH₃)-GST 融合蛋白。

表达和纯化

含克隆酵母 CBS 基因的 pGEX6P-2 表达载体（如上所述）转化到 TOP10 大肠杆菌细胞（Invitrogen）中。挑出单菌落且细胞培养物在含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中 30°C 生长直到 600nm 吸光度达到约 0.5 OD。为诱导 GST-CBS 融合蛋白表达（由 tac 启动子驱动），异丙基- β -D-硫代半乳糖苷（IPTG）加入生长培养基至 0.1mM 终浓度。CBS 酶辅因子吡哆醛 5'-磷酸也在诱导中加入生长培养基至 100 μ M 终浓度。然后诱导细胞在 30°C 生长另外 21 小时，接着离心收集。

然后如厂商（Amersham Pharmacia）规程所述，用谷胱甘肽琼脂糖 4B 亲和树脂亲和纯化 GST-CBS 蛋白。简单地，细胞悬浮于磷酸缓冲盐水（PBS）并在冰上由超声波破坏。然后 TritonX-100 加至 0.1%的终浓度（v/v），超声处理物在室温摇 30-45 分钟。细胞裂解物然后通过离心清除不溶碎片，用 DNase I 处理，上样到谷胱甘肽琼脂糖 4B 亲和树脂柱。非特异结合的蛋白质用 10 柱体积 PBS 洗去，然后

所需 GST-CBS 蛋白从亲和树脂洗脱,洗脱是通过加入 5 柱体积的洗脱缓冲液(50mM Tris,pH8、1.4mM β -巯基乙醇(BME)、100mM NaCl、0.1%(v/v) TritonX-100、50mM 还原型谷胱甘肽)。纯化 GST-CBS 融合蛋白然后通过考马斯蓝染色的 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠,聚丙烯酰胺凝胶电泳)确认。然后洗脱的 GST-CBS 透析到贮存缓冲液(50mM TrisHCl,pH8、100mM NaCl、5 μ M PLP),等分并在-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。然后纯化 GST-CBS 的浓度用 MICRO BCA 蛋白测定试剂盒(Pierce Chemical)确定。纯化 GST-CBS 的典型产量在 5-10mg GST-CBS 每克大肠杆菌团范围中。

CBS 活性测定

纯化酵母 GST-CBS 融合蛋白的 CBS 活性如 Kashiwamata 和 Greenberg (*Biochem. Biophys. Acta* 212:488-500(1970)) 所述进行。此测定以 CBS 从丝氨酸和高半胱氨酸合成胱硫醚的能力为基础。然后分光光度确定 CBS 形成的胱硫醚量,通过检测 455nm 的茚三酮反应色原并与标准曲线比较,标准曲线用已知胱硫醚浓度的样品产生。CBS 活性也通过下文所述酶测定或技术人员熟知的其它测定来确定。

实施例 4

ADH2CYS4 融合构建物的构建

酵母胱硫醚 β -合酶在酵母中的表达和纯化

在此例子中,强启动子 ADH2 插入 CYS4 基因上游且构建与酵母 CBS 基因的融合以促进较高蛋白质表达。ADH2 启动子由 Adr1p 调节,当酵母细胞在含葡萄糖的培养基中生长时被抑制,当细胞在非发酵性碳源中生长时去抑制。如果超量产生蛋白质对细胞致死,这可调节表达。

ADH2CYS4 基因的构建

酵母基因组 DNA 用引物 CI-029(CTATATCGTAATAATGACTAAATCTGAGCAG CAAGCCG ATTCA; SEQ ID NO:15) 和 CI-017(ATGATGATGATGATGATGAC CTCGTAAGTAGCTCAGTAA; SEQ ID NO:9) 扩增以产生所有没有终止密码子和转录终止子的 CYS4 基因。除了 CYS4 基因的前 10 个密码子,CI-029(SEQ ID NO:15) 引物包含克隆 ADH2 启动子区域的至少 13 个碱基。引物 CI-017(SEQ ID NO:9) 具有 CYS4 基因最后 6 个密码子的序列,终止密码子加甘氨酸残基和 6 个组氨酸残基除外。所得 PCR 产物包括 CYS4 编码区以及的甘氨酸和 6 个组氨酸残基的进一步编码序列。加入甘氨酸以增加翻译后聚-his 肽的空间灵活性。“终止子”片段通过扩增相同基因组 DNA 产生,使用引物 CI-018(CATCATCATCATCATCATTAAAT

AAGAACCCACGCT ; SEQ ID NO:10) 和 CI-040 (AGGGCTCGAGGATCC CGGGGGTGCTATTATGAATGCACGG; SEQ ID NO:16) 以产生具 TAA 终止密码子的聚-组氨酸序列, 接着是转录终止子。CI-029/CI-017 PCR 反应产生约 1530bp 的片段而 CI-018/CI-040 反应产生约 331bp 的片段。通过混合它们的 PCR 产物并用引物 CI-029/CI-040 扩增连接这两个片段。所得产物命名为 CYS4H 且长度约 1861bp。

为连接 ADH2 启动子到 CYS4H 基因片段, 首先用引物 CI-027 (CGGGGATCCGACGTTTTGCCCGCAGGCGGGAAACC, SEQ ID NO:17) 和引物 CI-028(AGATTTAGTCATTATTACGATATAGTTAATAGTTGATAG; SEQ ID NO:18) 从相同酵母基因组 DNA 产生 PCR 产物, 用于产生 ADH2 启动子序列。引物 CI-028 (SEQ ID NO:18) 包含 CYS4 基因编码区的前 12 个核苷酸。因此, 在引物 CI-028 (SEQ ID NO:18) 和 CI-029 (SEQ ID NO:15) 间有 25 个各自产物中互补 DNA 的核苷酸。ADH2 PCR 产物与 CYS4H 片段混合并用引物 CI-027 (SEQ ID NO:17) 和 CI-040 (SEQ ID NO:16) 扩增, 用于产生约 2201bp 的产物片段命名为 ADH2CYS4H。这些 PCR 产物各自通过限制性内切酶分析确认。

ADH2CYS4H 产物克隆到 YEp24, 这是用 BamHI 切割 DNA 和用 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化入大肠杆菌 (TOP10; Invitrogen) 细胞并在 LB-琼脂加氨苄青霉素板上平板培养。质粒根据厂商建议用质粒制备试剂盒 (Roche) 从推定重组子中制备, 通过限制性内切酶分析。发现具有正确插入的克隆质粒转化入酿酒酵母 (BJ5460) 且在补充 2%葡萄糖的无尿嘧啶合成完全培养基 (SC-ura) 上平板培养。2 天后推定重组子在相同类型平板上重划线培养以分离菌落。通过在 SC-ura 加 2%乙醇和 1%蛋白胨中生长诱导细胞, 通常补充 0.1%葡萄糖以使细胞能在 24 小时内生长。生长过夜后, 细胞通过离心收集且细胞沉淀保存于-70℃直到裂解。通过细胞沉淀重悬浮于 0.05 体积的裂解缓冲液原始体积来裂解细胞。玻璃珠然后加入缓冲液的弯液面。

全部悬浮液涡旋 1 分钟, 各 4 次。涡旋之间, 细胞在冰上冷却 1 分钟。裂解物转移到新管并以 10,000x g 离心 10 分钟。澄清的裂解物在 His-树脂柱 (Roche) 上分层, 根据厂商建议纯化蛋白质。部分纯化的蛋白质在 3 次洗脱中回收。

实施例 5

高半胱氨酸测定模式的非循环部分的例子

在此例子中, 证明丙酮酸和胱硫醚测定的非循环部分。

丙酮酸测定:

丙酮酸: 本发明提供高半胱氨酸测量, 其基础是用酶 CBS 和 CBL 使高半胱氨酸循环产生丙酮酸和氨。预测丙酮酸和氨产生的速度与样品中原始高半胱氨酸浓度成正比。用适当酶测量此速度提供均一高半胱氨酸方法的可能。

在发明的一方面, 开发了丙酮酸定量的高度敏感方法。在此方法中, 丙酮酸氧化酶使丙酮酸转变成乙酰磷酸、二氧化碳和过氧化物。过氧化物酶随后使过氧化物、TOOS 和 4-氨基安替比林转变成显示最大吸收接近 550nm 的色原。此色原的摩尔吸收率很高, 约 $36\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

使用表 1 所示试剂和表 2 所列 Cobas FARA (Roche, Basel, Switzerland) 仪器参数, 丙酮酸易通过早期-读数空白和终点反应在约 5-10 分钟内以 μM 范围测量。含水校准物的吸光度相对时间图示于图 1。实际校准曲线示于图 2。

表 1. 丙酮酸方法: 试剂成分

化学制剂	浓度
试剂 1	
HEPES, 半钠盐	21.5 mM
HEPES, 酸	28.6 mM
EDTA (4Na)	5.0 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	49.8 mM
K ₂ HPO ₄ , 二元	7.5 mM
TOOS	1.4 mM
TTHA	0.8 mM
TPP	0.2 mM
4-氨基安替比林	1.0 mM
BSA	1.9 g/L
亚铁氰化钾	0.07 mM
辣根过氧化物酶	3.0 KU/L
丙酮酸氧化酶	3.0 KU/L
PH=7.0	

表 2. 丙酮酸方法: Cobas FARA 参数	
参数	设置
综合	
测量模式	ABS
反应模式	P-A
校准模式	SLOPE AVG
试剂空白	REAG/DIL
波长	550nm
温度	37°C
分析	
样品体积	40 μ L
稀释体积	10 μ L
稀释名称	H ₂ O
试剂体积	250 μ L
温育时间	60 秒
起始试剂体积	无
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	无
温育时间	无
起始试剂 2 体积	无
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	无
温度延迟	无
吸光度读数	
第一次	0.5 秒
数量	14
间隔	30 秒
计算	
步骤数	1
计算步骤 A	动态
首先	1
最后	14
校准	
stds 数	1
STD1	50 μ M
重复	2

胱硫醚测定:

通过 CBL 加入上述丙酮酸试剂来测量胱硫醚。CBL 使胱硫醚转变成高半胱氨酸、丙酮酸和氨。丙酮酸然后如上所述测量。用于测量胱硫醚的试剂组成示于表 3。测量可用任何合适仪器进行。在本例子中，使用 Cobas FARA (Roche, Basel, Switzerland)。典型的反应参数示于表 4。图 3 描述了吸光度相对时间图，用胱硫醚水溶液获得。反应在少于 10 分钟内到达终点。

表 3. 胱硫醚方法: 试剂成分

化学制剂	浓度
试剂 1	
HEPES, 半钠盐	20.3 mM
HEPES, 酸	27.0 mM
EDTA (4Na)	4.7 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	47.1 mM
K ₂ HPO ₄ , 二元	7.1 mM
TOOS	1.3 mM
TTHA	0.8 mM
TPP	0.2 mM
4-氨基安替比林	0.9 mM
BSA	1.8 g/L
亚铁氰化钾	0.07 mM
辣根过氧化物酶	2.8 KU/L
丙酮酸氧化酶	2.8 KU/L
CBL	1.9 g/L
PH=7.0	

表 4. 胱硫醚方法: Cobas FARA 参数

参数	设置
综合	
测量模式	ABS
反应模式	P-A
校准模式	LIN INTER

试剂空白	REAG/DIL
波长	550nm
温度	37°C
分析	
样品体积	30 μ L
稀释体积	10 μ L
稀释名称	H ₂ O
试剂体积	260 μ L
温育时间	60 秒
起始试剂体积	无
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	无
温育时间	无
起始试剂 2 体积	无
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	无
温度延迟	无
吸光度读数	
第一次	0.5 秒
数量	21
间隔	60 秒
计算	
步骤数	1
计算步骤 A	终点
首先	1
最后	10
校准	
stds 数	1
STD1	50 μ M
重复	2

图 4 描述了用胱硫醚的水溶液获得的标准曲线。这些曲线至少在 0-100 μ M 的胱硫醚浓度范围是线性的。形成的发色团稳定约 15-20 分钟。然而，如果测定的样品的所含胱硫醚浓度高 10-20 倍，发色团明显有些不稳定。

在一些实验中，丝氨酸包括在反应混合物中。250 μ M 水平的丝氨酸没有表现出显著效果。；较高水平的丝氨酸也为本测定耐受。丝氨酸的非干扰性是一个重要的观察，因为高半胱氨酸测定需要丝氨酸存在。

实施例 6

高半胱氨酸的酶循环测定

在此例子中，提供确定高半胱氨酸浓度的酶循环系统，使用丙酮酸氧化酶/过氧化物酶信号系统或乳酸脱氢酶信号系统。

循环的证明：CBS/CBL/PO/HRP 酶循环系统

证明了循环系统，其中反应用高半胱氨酸或胱硫醚起始。这些实验中所用的试剂成分示于表 5。样品与试剂 1 混合后，单独加入 CBS 和丝氨酸，试剂 1 含所有其它成分。相关 Cobas FARA 参数示于表 6。胱硫醚或高半胱氨酸溶于水以制备适当浓度的标准。时间相对吸光度图示于图 5 和 6。在 3 到 6 分钟迟滞时间后，图为线性。典型的高半胱氨酸校准曲线（图 7）尽管不完全线性，可用于在合适样品中定量高半胱氨酸浓度。使用合适曲线-配合技术。

表 5. CBS/CBL 循环, PO/HRP 方法	
试剂成分	
化学制剂	浓度
试剂 1	
HEPES, 半钠盐	20.3 mM
HEPES, 酸	27.0 mM
EDTA (4Na)	4.7 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	47.1 mM
K ₂ HPO ₄ , 二元	7.1 mM
TOOS	1.3 mM
TTHA	0.8 mM
TPP	0.2 mM
4-氨基安替比林	0.9 mM
BSA	1.8 g/L
亚铁氰化钾	0.07 mM
辣根过氧化物酶	3.0 KU/L
丙酮酸氧化酶	3.0 KU/L
CBL	
PH=7.0	

试剂 SR1	
丝氨酸	3.1 mM
试剂 SR2	
CBS	1.23 g/L

参数	设置
综合	
测量模式	ABS
反应模式	P-I-SR1-I-SR2-A
校准模式	LIN INTER
试剂空白	REAG/DIL
波长	550nm
温度	37°C
分析	
样品体积	30 μ L
稀释体积	10 μ L
稀释名称	H ₂ O
试剂体积	260 μ L
温育时间	60 秒
起始试剂体积	30 μ L(丝氨酸)
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	5 μ L
温育时间	10 秒
起始试剂 2 体积	30 μ L(CBS)
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	5 μ L
温度延迟	Na
吸光度读数	
第一次	0.5 秒
数量	14
间隔	30 秒
计算	
步骤数	1
计算步骤 A	终点或动态

首先	1
最后	14
校准	
stds 数	1
STD1	50 μ M
重复	2

二硫键还原：

高半胱氨酸很少以还原、非二硫键状态存在于人血浆中。大部分高半胱氨酸经二硫键偶联到蛋白质或小分子。需要这些化合物的二硫化物还原以释放高半胱氨酸用于通过任何确定总高半胱氨酸的方法测量。此例子证明使用还原剂与用乳酸脱氢酶和 NADH 的系统相容。可能的候选还原剂包括 DTE、DTT、n-乙酰半胱氨酸、巯基乙酸、TCEP 等。为在本发明方法中使用这些化合物，需要精确调节还原剂浓度和仪器参数。一些还原剂的早期指示会阻碍丙酮酸氧化酶或辣根过氧化物酶作用，导致研究下述另外的丙酮酸检测系统。

循环的证明：CBS/CBL/LDH 系统：

丙酮酸在酶乳酸脱氢酶存在时与 NADH 反应以产生乳酸和 NAD。定量丙酮酸可通过测量在 340nm 的吸光度减少。NADH 的摩尔吸收率比过氧化物酶产生的色原小约 6 倍。然而，这不影响本发明的系统，因为 CBL/CBS 高半胱氨酸循环能产生相对大量的丙酮酸。

用于产生图 8、9、10&11 所示数据的试剂系统包括 HEPES 缓冲液 (pH7.2) 中的丝氨酸、CBL 和乳酸脱氢酶，作为第一种试剂。然后顺次加入 TRIS 缓冲液 (pH8.5) 中的 NADH 和 CBS。然而，所有成分可不同组合以形成 2 或 3 种试剂高半胱氨酸测量系统。试剂浓度示于表 7 且 Cobas FARA 参数示于表 8。调节 NADH 浓度以提供足够线性，同时血浆样品在 340nm 吸收。

表 7. CBS/CBL/LDH 循环系统：试剂成分	
化学制剂	浓度
试剂 1	
HEPES, 半钠盐	39.4 mM
HEPES, 酸	12.6 mM
丝氨酸	0.72 mM
乳酸脱氢酶	33,000 U/L
CBL	6.05 ug/L
PH=7.2	
试剂 SR1	
NADH	4.16 mM
TRIS	50 mM
PH=8.5	
试剂 SR2	
CBS	996 mg/L
TRIS	50 mM
氯化钠	100 mM
吡哆醛磷酸	5 uM
样品稀释	
DTT	13 mM
HEPES, 半钠盐	56.7 mM
HEPES, 酸	18.1 mM
PH=7.2	

表 8. CBS/CBL/LDH 循环系统: Cobas FARA 参数	
参数	设置
综合	
测量模式	ABS
反应模式	P-T-I-SR1-I-SR2-A
校准模式	LIN INTER
试剂空白	REAG/DIL
波长	340nm
温度	37°C
分析	
样品体积	30 μ L
稀释体积	10 μ L
稀释名称	H ₂ O(或还原剂)
试剂体积	250 μ L
温育时间	60 秒
起始试剂体积	15 μ L (NADH)
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	5 μ L
温育时间	10 秒
起始试剂 2 体积	30 μ L (CBS)
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	10 μ L
温度延迟	NA
吸光度读数	
第一次	5 秒
数量	16
间隔	30 秒
计算	
步骤数	1
计算步骤 A	终点或动态
首先	6
最后	20
校准	
stds 数	1
STD1	25 或 50 μ M
重复	2

分析水溶液:

系统对于检测水溶液中高半胱氨酸表现较好。典型的吸收相对时间图示于图 8 和 9。这些图是线性，明显的延滞期少或没有。NADH 消失速度相对高。此外，高半胱氨酸浓度相对吸光度的校准图在 0-100 μM 样品浓度范围为线性（图 10）。因此，校准仅需要一个校准物如 25 μM 以及试剂空白。

高半胱氨酸溶液在不同浓度制备以证明方法在 2-20 μM 高半胱氨酸浓度范围的表现。DTT 存在和缺乏时的结果示于表 9。如上所述，DTT 用于减少样品（如血清、血浆等）中的二硫键。DTT 不显著干扰乳酸脱氢酶催化反应。

高半胱氨酸浓度 (μM)	观察值 (μM)	
	(-) DTT	(+) DTT
2	2	1.2
5	5.2	4.3
8	8.2	7.4
10	10.4	9.9
12.5	12.7	12.5
16.7	16.8	16.3
20	20.5	20

分析以人血浆为基础的对照产物:

本文证明了 CBS/CBL/LDH 循环系统的精确性能，使用 Bio-Rad Co. 生产的以人血浆为基础的高半胱氨酸对照产物。使用不同浓度 DTT，改变温育时间以获得最佳高半胱氨酸回收。用 1.6-3.2 mM 浓度 DTT 温育 5-15 分钟时间产生的高半胱氨酸测量很好的在多种其它方法特定的范围内。

人血浆样品:

高半胱氨酸循环测定证明用 DTT 作为还原剂的人血浆样品性能良好。结果与独立实验室用 Abbott IMx 高半胱氨酸方法获得的结果很一致（图 11）。此实验所用 Cobas FARA 参数示于表 10 且试剂成分示于表 7。在此测定中，使用含水高半胱氨酸校准物（25 μM ）。以水为基础样品的吸光度相对时间图在 DTT 缺乏时为线性且在 DTT 存在时接近线性。然而，用血浆样品获得的图不同，即前 3 分钟后不是线性。在表 7 和表 10 概括的条件下，循环似乎随着时间逐步减慢。然而，图 11 所示相关性研究证明测试人血清样品时，本方法（概括于表 7 和表 10）与 IMx 所得的结果相对紧密一致。

表 10. CBS/CBL/LDH 循环系统：用于人血浆相关性研究的 Cobas FARA 参数	
参数	设置
综合	
测量模式	ABS
反应模式	P-T-I-SR1-I-SR2-A
校准模式	LIN INTER
试剂空白	REAG/DIL
波长	340nm
温度	37°C
分析	
样品体积	30 μ L
稀释体积	10 μ L
稀释名称	H ₂ O(或还原剂)
温度延迟	900 秒
试剂体积	250 μ L
温育时间	60 秒
起始试剂体积	15 μ L (NADH)
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	5 μ L
温育时间	10 秒
起始试剂 2 体积	30 μ L (CBS)
稀释名称	H ₂ O
稀释体积	10 μ L
温度延迟	NA
吸光度读数	
第一次	5 秒
数量	24
间隔	30 秒
计算	
步骤数	1
计算步骤 A	终点或动态
首先	1
最后	6
校准	
stds 数	1
STD1	25 或 50 μ M
重复	2

在一个较佳实施方案中，速度在反应起始后前 3 分钟测量。系统的另外最优化包括盐和去污剂浓度变化，可能使含水和血浆样品性能更一致。当成分结合到 2 或 3 种试剂混合物中时，测定同样精确。

实施例 7

高半胱氨酸测定的比较

在此例子中，测试了根据发明的一个较佳实施方案并与两个现有测定比较，即常规 HPLC 技术和商业购买的 IMx 测定。

发明的测定用表 11 所示 3 种试剂完成。第一种试剂 R1 开始以粉末形式且重建到 1.5g 粉末每 100mL 水的水平。总测定试剂盒也包括人血浆基质中以不同水平猛增的校准物以及加工人血浆基质中组成的 2 个对照样品，校准物含 L-胱硫醚。

表 11. CBS/CBL/LDH 循环系统：试剂成分	
化学制剂	浓度
试剂 1	
HEPES, 半钠盐	43.3 mM
HEPES, 酸	12.7 mM
丝氨酸	1.295 mM
乳酸脱氢酶	>800 U/L
NADH	1.06 mM
Triton X-100	0.05% v/v
叠氮化钠	7.7 mM
PH=8.0	
试剂 SR1	
DTE	6.75 mM
柠檬酸	20 mM
PH=2.0	
试剂 SR2	
CBS	18.7 KU/L
CBL	8.9 KU/L
山梨糖醇	1.65 M
氯化钠	100 mM
吡哆醛磷酸	5 μ M
叠氮化钠	7.7 mM
TRIS/HCl	50 mM
PH=8.0	

表 12. CBS/CBL/LDH 循环系统: Cobas MIRA 参数			
参数	设置	参数	设置
综合			
测量模式	吸收	转化因子	1.00
反应模式	R-S-SR1-SR2	抵消	0.00
校准模式	Lin Regre		
试剂空白	Reag/Dil	测试范围 低	开
清除器	无	高	开
波长	340nm	正常范围 低	无
小数位置	2	高	无
单位	umol/L		
		步骤数	1
分析			
稀释后因子	无	计算步骤 A	动态
浓度因子	无	读数 首先	18
		最后	32
样品循环	1	反应限制	无
体积	30.0 uL		
稀释名称	H2O	校准	
体积	25.0 uL	校准间隔	各运行
试剂循环	1	空白	
体积	90 uL	试剂范围 低	无
		高	无
起始 R1 循环	2	空白范围 低	无
体积	25 uL	高	无
稀释名称	H2O		
体积	25 uL	标准位置	1
		1	3.5 umol/L
起始 R2 循环	17	2	7.0 umol/L
体积	35 uL	3	17 umol/L
稀释名称	H2O	4	27 umol/L
体积	15 uL	5	47 umol/L
		6	无
计算		7	无
样品限制	无	重复	单次
反应方向	减少	偏差	
检验	关闭		
抗原过多	无	校正标准	无
		对照	
		CS1 位置	无
		CS2 位置	无
		CS3 位置	无

进行此测定时，使用商业购买的 Cobas MIRA 仪器。Cobas MIRA 软件能进行 50 个可程序化、25 秒的循环。尤其是仪器根据表 12 的参数编程。在循环 1 中，30 μ L 样品加入样品池，接着加入 25 μ L 冲洗水和 90 μ L 液体试剂 R1。在循环 2 开始时，加入 25 μ L 试剂 SR1 与另外的 25 μ L 冲洗水。随后，混合物可温育 15 个循环（6.25 分钟）以使还原剂释放任何结合的高半胱氨酸并破坏任何内源存在的丙酮酸。此时，加入 35 μ L CBS/CBL 酶试剂与另外的 15 μ L 冲洗水。循环 18 和 32 间随着时间测量的 340nm 吸光度减小，作为样品中高半胱氨酸的测量。样品加入和最终吸光度读数间的总测定时间是 32 个循环或 13 分钟 20 秒。由于多个样品平行运行，另外的样品结果通过 MIRA 以约每 30-90 秒 1 次的速度产生，这取决于运行长度和所用仪器校准物的数量。使用类似编程参数，此测定可适合甚至更快的仪器（如 RocheINTEGRA, Hitachi, ACE 等），能产生甚至更高的通量速度。

总共 24 个样品用发明测定和比较的已知测定来测试。下表 13 列出使用这三种方法得到的高半胱氨酸浓度。图 12-14 是描述表 13 结果的相关图。如可见到的，发明方法与 IMx 和 HPLC 紧密相关，通常与 IMx 更一致。然而，本方法花费低许多，运行较快，可用一般商业购买的化学分析器进行。

如表 14 所示，发明表现出非常好的运行间精确性。通常高半胱氨酸浓度约为 7-20 μ mol/L 时，发现运行内浓度变化 CV 小于 4%。

表 13. 高半胱氨酸测定的比较			
样品#	高半胱氨酸浓度 [μ M]		
	HPLC	发明	IMx
1	9.5	11.5	11.7
2	14.3	13.1	12.1
3	8.8	7.8	7.5
4	10.6	10.1	9.4
5	10.5	10.1	9.9
6	8.6	9.2	7.2
7	7.6	5.8	6.2
8	5.2	3.5	3.1
9	9.6	9.3	9.7
10	7.7	8.7	7.5
11	11.2	11.1	9.4
12	10.5	8.3	8.1
13	11.9	8.4	8.3
14	10.8	9.2	8.9
15	14.1	12.3	12.5
16	24.3	16.3	17.9
17	20.9	17.7	17.8
18	24.2	22.7	22.1
19	33.6	26.4	26.4
20	21.0	20.7	18.9
21	22.7	19.6	18.1
22	20.5	17.3	16.6
23	25.6	23.3	22.0
24	20.5	17.0	15.8
平均	15.2	13.3	12.8
截距[HPLC]		1.4	0.9
斜率[HPLC]		1.2	1.2
R[HPLC]		0.957	0.974
截距[IMx]	-0.3	0.5	
斜率[IMx]	0.8	1.0	
r[IMx]	0.976	0.990	

表 14. 运行间精确性				
样品	高半胱氨酸浓度 ($\mu\text{mol/L}$)			%CV
	运行 1	运行 2	平均	
1	16.35	16.46	16.41	0.47
2	12.13	12.58	12.36	2.58
3	19.45	21.6	20.53	7.41
4	16.29	16.79	16.54	2.14
5	11.13	10.01	10.57	7.49
6	7.33	7.56	7.45	2.18
7	6.31	7.24	6.78	9.71
8	7.13	5.54	6.34	17.75
9	14.87	14.5	14.69	1.78
10	13.81	13.41	13.61	2.08
11	26.86	28.66	27.76	4.58
12	12.45	13.05	12.75	3.33
13	10.15	10.74	10.45	3.99
14	9.6	10.39	10.00	5.59
15	12.53	13.67	13.10	6.15
16	14.60	15.20	14.90	2.85
17	25.03	25.65	25.34	1.73
18	20.77	20.03	20.40	2.56
19	31.83	32.10	31.97	0.60
20	36.86	36.43	36.65	0.83
21	11.65	11.48	11.57	1.04
22	40.22	38.25	39.24	3.55
23	31.68	32.62	32.15	2.07
24	7.68	6.38	7.03	13.08
平均 CV(%)=4.22				

实施例 8

试剂浓度变化的效果

在此例子中，实施例 7 中所述的发明优选测定用改变一些试剂成分进行，即 LDH、NADH 和丝氨酸。这是为了确定这些试剂成分的最佳量。测定如上所述进行，各成分浓度有变化。表 15 列出这些测试的结果。

表 15. 试剂成分浓度变化的效果				
[LDH] (U/L) 终反应混合物	斜率 (mA/分钟/ μ M)	截距 mA/分钟	空白 mA/分钟	对照样品的目标高 半胱氨酸范围： 25-35 μ M
114.5	1.21	-0.14	-10.2	25.8
229.3	1.14	0.12	-11.2	28.1
458.7	1.17	0.14	-11.3	26.6
917.5	0.88	1.89	-11.3	27.2
[NADH] (mM)				
0.130	0.77	4.23	-10.7	32.9
0.259	1.12	0.05	-11	25.2
0.389	1.09	0.45	-10.7	26.8
0.519	1.13	0.49	-11.1	26.0
[丝氨酸] (mM)				
0.125	0.64	2.23	-6.7	30.9
0.25	0.92	1.26	-9.0	28.1
0.5	1.13	0.63	-10.8	27.1
1	1.16	0.15	-13.6	28.3
2	1.23	0.33	-15.4	28.2

表 15 所示结果能选择最终试剂成分水平，提供具最小空白速度的适当敏感性，同时也尝试将试剂成本减少到最低程度。

实施例 9

R1 制剂变化对循环测定的效果

此例子确定 pH 变化的效果, 改变 pH 是通过将缓冲液变为 pH8.4 的 250mM TRIS 并加入脂肪酶和 α -环糊精到试剂 1。进行这些制剂变化后, 然后测试该测定的性能。表 16 详细描述了用于这些实验的试剂成分。

表 16. CBS/CBL/LDH 循环系统: 试剂成分

化学制剂	浓度
试剂 1	
TRIS	250 mM
α -环糊精	0.1%
脂肪酶	≥ 200 kU/L
丝氨酸	1.295 mM
乳酸脱氢酶	>800 U/L
NADH	1.06 mM
Triton X-100	0.05% v/v
叠氮化钠	7.7 mM
PH=8.2	
试剂 SR1	
TCEP	26.3 mM
试剂 SR2	
CBS	28.5 KU/L
CBL	9.4 KU/L
甘油	10%
山梨糖醇	1%
吡哆醛磷酸	5 μ M
叠氮化钠	7.7 mM
磷酸钾	100 mM
PH=7.6	

通过将试剂 1 的缓冲液变为 pH8.4 的 250mM TRIS, 改进测定一致性。这是因

为 CBS 和 CBL 在 pH8.4 明显更活跃且循环速度增加到 3 倍。

加入脂肪酶和 α -环糊精以对付有时在临床实验室遇到的混浊（脂血症）样品相关问题。当样品取自的病人在取血样前不久进食过或病人患的某些疾病过程正在进行中，可能产生这种样品。混浊可干扰此测试结果，通过在 340nm 产生高吸光度从而仪器不能准确测量 NADH 转变成 NAD 所产生的吸光度小变化。混浊也可强烈地干扰此测试结果，通过测量 NADH 到 NAD 转化中随着时间的改变。例如，如果混浊量减少，340nm 的吸光度也降低，因为光散射小。此效果加大丙酮酸降低引起的吸光度减小，所得高半胱氨酸确定可能显著太高。脂肪酶和 α -环糊精加入 R1 降低样品的混浊，大概通过脂肪酶水解甘油三酸酯为甘油和游离脂肪酸以及游离脂肪酸与 α -环糊精形成复合体。因此，混浊反应混合物在加入 SR2(R3) 时清除，加入 SR2(R3) 用于精确测量丙酮酸产生速度。许多混浊反应混合物的 340nm 吸光度迅速减小且几分钟内水平消失。高半胱氨酸结果精确。然而，一些混浊样品在加入 SR2(R3) 前没有完全清除，因而一些样品的结果有点不精确。尽管如此，使用脂肪酶和 α -环糊精似乎是混浊样品获得准确结果的一种很有希望的方法。

除了试剂构成的变化，体积也变化以评估它们对测定性能的效果。这些变化反映在表 17 中，它显示 Cobas MIRA 的典型循环参数。这些变化后，对 86 个人样品进行相关性研究，结果示于表 18。

表 17. CBS/CBL/LDH 循环系统: Cobas MIRA 参数

参数	设置	参数	设置
综合			
测量模式	吸收	转化因子	1.00
反应模式	R-S-SR1-SR2	抵消	0.00
校准模式	线性回归		
试剂空白	Reag/Sol	测试范围 低	开
清除器	无	高	开
波长	340nm	正常范围 低	无
小数位置	2	高	无
单位	$\mu\text{mol/L}$		
		步骤数	1
分析			
稀释后因子	无	计算步骤 A	动态
浓度因子	无	读数 首先	20
		最后	31
样品循环	1	反应限制	无
体积	20.0 μL		
稀释名称	H2O	校准	
体积	45.0 μL	校准间隔	各运行
试剂循环	1	空白	
体积	90 μL	试剂范围 低	无
		高	无
起始 R1 循环	2	空白范围 低	无
体积	21 μL	高	无
稀释名称	H2O		
体积	26 μL	标准位置	1
		1	0.0 $\mu\text{mol/L}$
起始 R2 循环	17	2	8.5 $\mu\text{mol/L}$
体积	13 μL	3	17.2 $\mu\text{mol/L}$
稀释名称	H2O	4	25.2 $\mu\text{mol/L}$
体积	10 μL	5	43.0 $\mu\text{umol/L}$
		6	无
计算		7	无
样品限制	无	重复	两次
反应方向	减少	偏差	
检验	关闭		
抗原过多	无	校准标准	无
		对照	
		CS1 位置	无
		CS2 位置	无
		CS3 位置	无

表 18. 表 16 和 17 所列改进的相关性数据

样品	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch ($\mu\text{mol/L}$)
2-01	11.0	12.0
2-02	17.7	17.3
2-03	18.6	18.4
2-04	22.1	21.2
2-05	12.2	13.8
2-06	15.2	14.9
2-07	17.6	20.4
2-09	51.8	49.9
2-11	29.1	28.2
2-13	19.6	19.2
2-15	25.0	24.7
2-16	22.9	23.7
2-17	21.9	21.3
2-18	25.0	23.80
2-19	22.2	22.10
2-21	23.6	20.80
2-22	13.0	13.60
2-23	23.1	21.80
2-24	17.0	17.60
2-26	15.9	14.80
2-27	8.8	9.30
2-28	9.1	9.40
2-29	5.2	5.40
2-30	8.2	8.10
2-31	4.7	5.40
2-32	6.6	6.80
2-33	7.8	8.10
2-34	7.0	7.0
2-35	6.9	7.3

2-36	4.8	5.7
4-01	7.2	7.3
4-02	7.3	9.1
4-03	6.2	5.8
4-04	9.5	9.5
4-05	6.2	7.4
4-06	8.2	8.0
4-07	6.8	6.7
4-08	8.1	7.4
4-09	6.5	7.9
4-10	7.5	8.5
4-11	8.1	8.6
4-12	6.1	5.7
4-13	6.19	6.20
4-14	5.31	5.90
4-15	7.17	6.80
4-16	5.05	7.00
4-17	5.93	7.80
4-18	8.57	8.10
4-19	4.87	5.70
4-21	19.37	19.50
4-22	8.61	9.30
4-23	11.02	12.50
4-24	12.75	13.30
4-25	12.28	12.00
4-26	14.63	14.30
4-27	9.33	11.30
4-29	18.39	19.60
4-30	14.13	14.20
4-31	8.63	8.60
4-32	9.95	9.80

4-33	8.08	10.20
4-34	12.34	12.00
4-35	12.16	13.10
4-36	15.75	16.30
4-37	14.37	14.30
4-38	14.72	15.20
4-39	10.26	11.20
4-40	12.26	14.00
4-41	24.62	25.00
4-43	27.25	29.50
4-46	21.26	19.60
4-47	22.08	23.30
4-50	15.14	15.50
E1	4.74	4.90
E2	8.24	8.00
E3	5.10	5.30
E6	13.79	14.50
E8	8.79	10.00
E9	10.57	11.50
E11	7.10	7.40
E13	7.65	7.30
E14	12.19	12.30
E15	6.47	6.14
E16	5.28	4.70
E20	7.93	7.80
平均	12.6	12.9
斜率		0.957
截距		0.8135
R		0.9927

如此比较表所示，与商业购买的 IMx 测定相比，用变化制剂的该测定结果很精确。

实施例 10

使用其它去污剂和它们的浓度变化

在此例子中，不同去污剂与 EDTA 组合使用作为 R1 成分。已知 EDTA 稳定脂质颗粒。此外，当样品混浊时目标是获得精确结果。尤其是研究去污剂 Brij-35 和 Genapol X-80。发现 EDTA 在 2.5mM 浓度特别有效，在分析脂血症的样品时有助于使混浊变化引起的吸光度非特异减小到最低程度。去污剂浓度也如表 19 和 20 所示变化。试剂 R1 的一种优选组成示于表 21。Brij-35 以 0.025% v/v 水平存在且 EDTA 以 2.5mM 存在。脂肪酶和 α -环糊精不存在，因为 EDTA 存在时获得混浊样品精确性似乎不需要它们。Brij-35 (0.025%) 也加入 SR2(R3)，取代 Triton X-100。这可能是一种有前途的取代，因为一些国家认为 Triton X-100 对环境有害。表 22 显示用优选试剂成分进行的相关性研究的结果。

表 19. 改变的 Genapol X-80 浓度

样品	IMx (μ mol/L)	R1 中 Genapol X-80 浓度变化的结果 (μ mol/L)		
		<u>0.1 %</u>	<u>0.3 %</u>	<u>0.5 %</u>
低	7.00	6.31	6.19	5.64
中等	12.50	11.96	11.48	10.37
高	25.00	23.08	22.96	22.86
D910	14.30	14.38	14.50	14.11
D912	9.40	9.41	10.60	9.50
D913	5.00	5.58	6.47	4.53
D915	21.20	23.85	21.93	20.92
PBI 27	7.40	7.69	7.70	6.82
PBI 28	6.80	7.33	7.19	5.96
PBI 29	7.10	7.83	7.50	6.85
PBI 10	8.90	9.61	9.07	7.67
MAS 1	5.90	4.63	4.45	4.15
MAS 2	14.50	14.46	15.33	14.47
MAS 3	23.10	22.60	23.07	23.65
D913X2	2.50	2.45	2.46	2.17
平均	11.37	11.41	11.39	10.64

表 20. R1 中改变的 Brij-35 浓度

样品	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch 结果 ($\mu\text{mol/L}$) 作为 R1 中 Brij-35 浓度的函数			
		0.025%	0.05%	0.1%	0.5%
1	5.88	5.03	5.35	5.26	5.09
2	14.57	15.46	16.20	15.92	15.60
3	23.52	24.66	24.89	23.67	24.02
2	6.49	6.80	7.04	8.44	10.74
18	10.15	10.72	11.29	9.95	10.42
21	4.62	4.86	5.84	5.73	4.96
32	8.90	8.17	8.38	8.67	8.43
平均	10.59	10.81	11.28	11.09	11.32

表 21. CBS/CBL/LDH 循环系统: 试剂成分

化学制剂	浓度
试剂 1	
TRIS	250 mM
EDTA	2.5 mM
丝氨酸	1.295 mM
乳酸脱氢酶	>800 U/L
NADH	1.06 mM
Brij-35	0.025% w/v
叠氮化钠	7.7 mM
PH=8.2	
试剂 SR1	
TCEP	26.3 mM
试剂 SR2	
CBS	28.5 KU/L
CBL	9.4 KU/L
甘油	10%
山梨糖醇	1%
吡哆醛磷酸	5 μM
叠氮化钠	7.7 mM
磷酸钾	100 mM
PH=7.6	

表 22. 最佳改进的相关性数据

样品	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch ($\mu\text{mol/L}$)
1	5.90	5.15
2	14.57	15.36
3	23.52	23.52
701	17.95	17.03
702	11.51	11.55
703	11.81	12.97
704	10.13	10.64
705	22.37	21.87
706	16.97	16.79
707	7.76	7.76
708	9.35	9.90
709	7.33	6.60
710	7.24	6.90
711	8.50	8.54
712	19.93	19.00
713	6.82	6.04
715	6.91	6.93
716	7.35	7.05
717	9.44	9.26
718	14.16	15.61
719	5.73	5.25
720	6.32	6.00
721	11.30	12.75
722	16.23	17.55
723	11.77	12.11
724	8.39	9.72
725	10.17	11.48
726	6.69	6.14
727	8.01	7.50
728	10.45	10.64
729	11.73	11.27
730	14.39	14.87
731	8.61	8.76
732	7.56	7.67
733	7.35	7.56
734	6.54	8.34
735	8.39	7.91
平均	10.79	10.92
斜率		1.0035
截距		0.0195
R		0.9873

当 Brij-35 和 EDTA 取代 Triton X-100 和脂肪酶加 α -环糊精时, 清除一些混浊反应混合物。然而, 也许没有同样使用脂肪酶和 α -环糊精的情况多。重要的是, 340nm 的吸光度用零变化速度迅速稳定。然后加入 SR2 (R3) 时, 准确测量丙酮酸产生的速度, 甚至在样品看上去像牛奶的情况中获得精确结果。当加入 R1 和 SR2 (R3) 间的时间缩短 2-4 分钟时也如此, 这对于将本发明的高半胱氨酸测定应用于其它自动仪器是必需的。

实施例 11

将还原剂变为 TCEP 和改变 TCEP 浓度的结果

对于此例子, 还原剂 DTE 用 tris-(2-羧乙基磷化氢) 盐酸盐 (TCEP) 取代。TCEP 的优点是在纯化水中稳定时间延长。TCEP 取代 DTE 使试剂空白反应从约 12 到 15 mA/分钟减小到约 4 到 5 mA/分钟。较低试剂空白能使高半胱氨酸测定更精确。为发现此高半胱氨酸测定的最佳 TCEP 浓度, 测试了浓度范围。这些实验的结果示于表 23。

表 23. R1 中改变的 TCEP 浓度

高半胱氨酸结果 ($\mu\text{mol/L}$)

SR1 制剂	IMx	Catch 测定					
		A	B	C	D	E	F
MAS 1	5.88	6.37	6.18	5.48	5.51	4.42	4.17
MAS 2	14.57	16.49	15.67	15.95	16.03	15.80	14.77
MAS 3	23.52	23.19	21.98	23.33	25.11	24.02	23.09
PBI 20	7.2	5.81	6.24	7.81	8.00	6.95	8.33
PBI 22	7.8	7.61	7.66	8.28	8.69	8.44	8.23
PBI 36	5.1	4.16	4.61	4.71	5.05	5.18	4.71
PBI 39	4.6	3.11	4.25	4.38	4.47	3.68	4.09
Doreen 709	7.33	6.68	6.64	6.71	7.28	6.23	6.43
平均	9.50	9.17	9.15	9.58	10.02	9.34	9.22

TCEP 浓度: A=6.3mM ; B=13.85mM; C=26.44mM; D=32.74mM; E=39.03mM;
F=52.88mM

实施例 12

确定将 R3 缓冲液变为磷酸盐并加入甘油到缓冲液的效果

为获得稳定性更长和与测定相容性的酶混合物，酶制剂变为半衰期显著长于前面制剂的混合物。重要的变化包括用磷酸盐取代 Tris 缓冲液并加入甘油到缓冲液。使用浓度范围从 50mM 到 500mM 的 pH7.6 磷酸钾和浓度范围从 0.5%到 15.0%(v/v) 的甘油。这些变化使半衰期在 4°C 从几周显著增加到超过 1 年。在优选形式中，磷酸钾范围可从约 50mM 到 250mM。磷酸钾范围可更优选从约 75mM 到 150mM。此实验中特别有效的磷酸钾浓度是 100 mM。甘油范围可从约 1-15%。此范围更优选从约 5-13%。此实验中特别有效的甘油范围是 10%。

实施例 13

使用不同仪器获得的结果

为确定所有测定变化产生的总体改进，通过特异于仪器的书面操作对一些仪器进行精确评估。表 24 列出 Roche Hitachi 911 根据本发明所用参数和设置且表 25 列出用 Beckman CX-5 时的相同参数和设置。下表显示这些精确测试的结果。这些结果显著优于测定早期制剂所得结果。在 Hitachi 911（表 26）和 Beckman CX-5（表 27）仪器中，所示各样品运行 20X 并确定运行内精确度。低至 5.92 $\mu\text{mol/L}$ 的样品 C. V. 百分比为 3.31%且范围在 23.01 $\mu\text{mol/L}$ 到 25.4 $\mu\text{mol/L}$ 的样品为 1.9% 到 2.03%。7.3%和 2.6%间的总精确度（表 28）用高半胱氨酸值为 4.6 $\mu\text{mol/L}$ 和 27.0 $\mu\text{mol/L}$ 的样品在 Cobas MIRA Plus 上获得。各样品重复 2 次运行，2X 每天，总共 20 天。

表 24. Roche Hitachi 911 的 Catch 高半胱氨酸方法参数

测试	THCY
测定编码	速度-A, 15
波长 (第二/主要)	376/340
测定点	35-49-0-0
血清	
S. Vol. (正常)	28
S. Vol. (减少)	20
S. Vol. (增加)	30
尿	
S. Vol. (正常)	10
S. Vol. (减少)	10
S. Vol. (增加)	10
ABS. 限制	0-0-减少
前区限制	0-0-降低
试剂	
T1	200 μ L-0-0-00322-0
T2	25 μ L-0-0-00322-0
T3	0-0-0-00322-0
校准类型	线性-2-2-0
自动暂停时间	
空白	0
跨度	0
2 点	0
全部	0
自动变化	
分配器 (lot)	取消
瓶	取消

经键盘选择测试:	进入
SD 限制	100
重复限制	1000
敏感性限制	0
S1 ABS 限制	(-32000) (32000)
补偿限制	空白
参数页 2	
测试	THCY-00322
测试名称	THCY 单位: $\mu\text{mol/L}$
数据模式	成并排行 (on board)
报告名称	高半胱氨酸
对照间隔	0
仪器因子 ($Y=a \times +b$)	
A	1
B	0
预期值	用户定义
技术限制	
血清	0-10000
尿	(-99999) (999999)
标准	Conc. -Pos. -样品 -Pre. -Dil. -Calib.
1	0.0-18-28-0-0-501
2	25.2-26-28-0-0-026
3	0
4	0
5	0
6	0

对于此实验, 通过 R1 与去离子水以 9 到 8.1 的比例混合制备 T1。试剂 T2 和 T4 分别与试剂 SR1 和 SR2 相符合。

表 25. Beckman CX-5 的 Catch 高半胱氨酸方法参数

化学名称:	高半胱氨酸
测试名称	HOMO
校准因子:	0
反应类型:	速度 1
数学模型:	线性
计算时间限制:	24 小时
反应方向:	减少
校准器数	2
单位:	$\mu\text{mol/L}$
小数精确	X.XX
主要波长:	340nm
第二波长:	380nm
样品体积	25 μL
主要注射试剂:	
A	179 μL
B	22 μL
第二注射试剂	
C	14 μL
加入时间:	592 秒
校准器	
#1	0.00
#2	24.8
多点跨度	
1-2:	-0.001
试剂空白	
起始读数:	100 秒
终止读数:	200 秒
ABS 下限:	-1.5
ABS 上限:	1.5
适用范围	
下限:	0.00
上限:	99999.00
底物消耗	
起始速度:	-99.999
δ ABS	1.5

对于此例子，通过 R1 与去离子水以 9 到 8.1 的比例混合制备 A。试剂 B 和 C 分别与 MIRA 试剂 SR1 和 SR2 相符合。

表 26. Hitachi 911 的运行内精确度

		运行内
低 平均数=8.3 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.224
	%C. V.	2.17
中等 平均数=11.9 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.324
	%C. V.	2.71
高 平均数=25.4 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.516
	%C. V.	2.03

表 27. Beckman CX-5 的的运行内精确度

		运行内
低 平均数=5.92 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.196
	%C. V.	3.31
中等 平均数=11.12 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.195
	%C. V.	1.70
高 平均数=23.01 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.437
	%C. V.	1.90

表 28. Roche MIRA-Plus 的总精确度

		运行内	运行间	天数间	总计
低 平均数=4.6 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.31	0.14	0.04	0.34
	%C. V.	6.6	3.1	0.8	7.3
中等 平均数=11.6 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.40	0.08	0.23	0.47
	%C. V.	3.5	0.7	2.0	4.0
高 平均数=27.0 $\mu\text{mol/L}$	标准偏差	0.44	0.39	0.39	0.71
	%C. V.	1.6	1.5	1.4	2.6

实施例 14

测定对 2-试剂系统的适应性

本发明也适用于仅使用 2 种试剂的系统。这使发明适应范围更广的仪器，包括仅能使用 2 种试剂的仪器。表 29 显示 2-试剂系统的试剂成分且表 30 显示测定如何在化学分析仪上进行的 MIRA-Plus 参数。表 31 显示用 3-试剂系统相对 2-试剂系统所获得的比较数据。

表 29. CBS/CBL/LDH 循环系统: 2-试剂的试剂成分	
化学	浓度
试剂 1	
TRIS	250 mM
EDTA	2.5 mM
丝氨酸	1.295 mM
乳酸脱氢酶	>800 U/L
NADH	1.06 mM
Brij-35	0.025% v/v
叠氮化钠	7.7 mM
TCEP	4.05 mM
PH=8.2	
试剂 SR1	
CBS	28.5 KU/L
CBL	9.4 KU/L
甘油	10%
山梨糖醇	1%
吡哆醛磷酸	5 μ M
叠氮化钠	7.7 mM
磷酸钾	100 mM
PH=7.6	

表 30. 2-试剂的 CBS/CBL/LDH 循环系统: Cobas MIRA 参数			
参数	设置	参数	设置
综合			
测量模式	吸收	转化因子	1.00
反应模式	R-S-SR1-SR2	抵消	0.00
校准模式	线性回归		
试剂空白	Reag/Sol	测试范围 低	开
清除器	无	高	开
波长	340nm	正常范围 低	无
小数位置	2	高	无
单位	$\mu\text{mol/L}$		
		步骤数	1
分析			
稀释后因子	无	计算步骤 A	动态
浓度因子	无	读数 首先	19
		最后	30
样品循环	1	反应限制	无
体积	20.0 μL		
稀释名称	H ₂ O	计算校准	
体积	45.0 μL	校准间隔	各运行
试剂循环	1	空白 Sol-Pos	1
体积	137 μL	试剂范围 低	无
		高	无
起始 R1 循环	16	空白范围 低	无
体积	13 μL	高	无
稀释名称	H ₂ O		
体积	10 μL	标准位置	1
		1	0.0 $\mu\text{mol/L}$
计算		2	8.5 $\mu\text{mol/L}$
样品限制	无	3	17.2 $\mu\text{mol/L}$
反应方向	减少	4	25.2 $\mu\text{mol/L}$
检验	关闭	5	43.0 $\mu\text{umol/L}$
抗原过多	无	6	无
		7	无
		重复	两次
		偏差	
		Std 修正	无
		对照	
		CS1 位置	无
		CS2 位置	无
		CS3 位置	无

表 31. 2-试剂系统相对 3-试剂系统的比较

样品	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch Inc. Hcy 测定 ($\mu\text{mol/L}$)	
		2-试剂系统	3-试剂系统
MAS 1	5.88	5.55	5.17
MAS 2	14.57	16.14	15.70
MAS 3	23.52	23.99	23.47
P 10	8.90	9.32	9.65
P 11	7.60	7.45	7.27
P 33	7.80	8.11	8.29
P 34	5.93	5.21	5.69
754+848	16.00	15.68	6.15
平均	11.28	11.43	11.42

实施例 15

本发明对使用单点校准的适应性

本发明的高半胱氨酸测定也适用于单校准点，零校准器作为空白。下表 32 显示在 Mira 仪器上进行单点校准的参数。下面的数据（表 33）显示在斜率平均模式中使用单点校准产生的结果与使用多点校准曲线大体上相同。

表 32. CBS/CBL/LDH 循环系统：单点校准的 Cobas MIRA 参数			
参数	设置	参数	设置
综合			
测量模式	吸收	转化因子	1.00
反应模式	R-S-SR1	抵消	0.00
校准模式	线性回归		
试剂空白	Reag/Sol	测试范围 低	开
清除器	无	高	开
波长	340nm	正常范围 低	无
小数位置	2	高	无
单位	$\mu\text{mol/L}$		
		步骤数	1
分析			
稀释后因子	无	计算步骤 A	动态
浓度因子	无	读数 首先	19
		最后	30
样品循环	1	反应限制	无
体积	20.0 μL		
稀释名称	H ₂ O	计算	
体积	45.0 μL	计算间隔	各运行
试剂循环	1	空白 Sol-Pos	1
体积	137 μL	试剂范围 低	无
		高	无
起始 R1 循环	16	空白范围 低	无
体积	13 μL	高	无
稀释名称	H ₂ O		
体积	10 μL	标准位置	4
		1	25.2 $\mu\text{mol/L}$
计算		2	无
样品限制	无	3	无
反应方向	减少	重复	两次
检验	关闭	偏差	
抗原过多	无		
		校正标准	无
		对照	
		CS1 位置	无
		CS2 位置	无
		CS3 位置	无

表 33. 单点相对多点校准

样品	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch Inc. Hcy 测定 ($\mu\text{mol/L}$)	
		单点校准	多点校准
MAS 1	5.88	5.03	5.17
MAS 2	14.57	15.18	15.70
MAS 3	23.52	22.97	23.47
PBI 10	8.90	8.82	9.65
PBI 11	7.60	8.26	7.27
PBI 33	7.80	8.05	8.29
PBI 34	5.93	5.80	5.69
754+848	16.00	15.17	6.15
平均	11.28	11.16	11.42

实施例 16

WO 00/28071 所述高半胱氨酸测定的研究

PCT 出版物 WO 00/28071 详细描述了一种高半胱氨酸测定。在“第一个实施方案”中，测定是没有还原步骤进行的。为将此方法转变成用于人血浆高半胱氨酸测量，必须结合单独的脱机 (off-line) 或均匀还原步骤。出版物 WO 00/28071 描述了一个单独的脱机还原步骤，也许是因为使用丙酮酸氧化酶循环系统。此步骤需要分析还原样品前的 20 分钟温育，这大幅增加总测定时间和劳动成本。此外，如果样品要在临床实验室中分析超过一个分析物，主要血清或血浆样品必须分成两等分，一个用于高半胱氨酸测试，一个用于任何其它有序实验室测试。相反，由于使用 LDH 循环系统 (实施例 7)，本发明能还原高半胱氨酸。

在实施例 16 (表 34) 中，显示 DTT 确实干扰 WO 00/28071 的“第二个实施方案”所述丙酮酸氧化酶检测系统。特别，使用“第二个实施方案”所述试剂和 DTT 组合物，有和没有 DTT 的测定用 Cobas FARA 仪器相对已知丙酮酸标准 (12.5、25 和 $50\mu\text{mol/L}$) 进行。在 DTT 测试情况中， $40\mu\text{L}$ 的各标准混合 $30\mu\text{L}$ DTT 溶液，接着温育 100 秒。然后，加入 $90\mu\text{L}$ 丙酮酸氧化酶试剂并温育 30 秒。然后在 30、60、90、120、150、180 和 220 秒取吸光度读数。在“无 DTT”测试中，进行相同过程，除了没有 DTT 加入。表 34 列出用 210 秒读数的此实验结果。图 15 和 16 进一步阐述此测试结果。

表 34. DTT 对 PO/HRP 丙酮酸检测系统的效果		
	没有 DTT	有 DTT
空白	0.0021	-0.0021
因子	2212	-11765
50 μ mol/L 标准	51.5	35.3
25 μ mol/L 标准	24.1	0.0
12.5 μ mol/L 标准	9.7	-21.2
在 30 秒的 δ 变化 (50 μ mol 标准)	0.0643	-0.0062
在 90 秒的 δ 变化 (50 μ mol 标准)	0.0890	-0.0103
在 120 秒的 δ 变化 (50 μ mol 标准)	0.0903	-0.0113
在 210 秒的 δ 变化 (50 μ mol 标准)	0.0906	-0.0113

这些数据清楚证明，WO 00/28071 的“第二个实施方案”所述单独还原步骤的必要性。还原剂的存在干扰用于测定丙酮酸的丙酮酸氧化酶检测系统。因此，这里所列数据确定费时的单独脱机还原步骤在“第二个实施方案”中必需。此外，WO 00/28071 所述脱机还原步骤相对本发明可能显著提高测定复杂性和成本。

尽管上述发明通过说明和例子详细描述以使理解透彻，显然可在所附权利要求范围内进行一些变化和修改。因此，发明范围不应参照上面描述确定，而应参照所附权利要求以及它们的等价物的全部范围确定。

本专利申请引用的所有出版物和专利文件全部纳入供参考，在相同程度上用于所有目的，似乎各单独出版物或专利文件被单独地表示。

- <110> G.川崎 (KAWASAKI,GLENN)
 H.K.韦伯 (WEBB,HEATHER K.)
 J.欧文斯 (OVENS,JEFFREY)
 R.里德克 (LIEDTKE,RAYMOND)
 D.弗里斯特 (FOREST,DOREEN)
 M.莱加兹 (LEGAZ,MARK)
 G.罗森 (LAWSON,SOBOMABO)
- <120> 用于高半胱氨酸和胱硫醚的酶促循环测定
- <130> 30865
- <150> 60/163,126
 <151> 1999-11-02
- <150> 09/704,036
 <151> 2000-11-01
- <150> 60/203,349
 <151> 2000-05-10
- <160> 21
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工的
- <220>
 <223> PCR引物
- <220>
 <221> misc_feature
 <223> 人工序列的描述: PCR引物
- <400> 1
 cgacggatcc gatggcggac aaaaagcttg 30
- <210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<220>

<221> misc_feature

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 2

cgcagcagct gttatacaat tcgcgcaaa

29

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<220>

<221> misc_feature

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 3

cggggatcct gatgcatgca tgataagga

29

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<220>

<221> misc_feature

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 4

cggcattacc gttcactaa tttattg

27

<210> 5

<211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 5
 gttggatccg gcattaccgt ttac 25

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> PCR引物

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 6
 ggtggatcca tcaatagata cgtacgtcct 30

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> PCR引物

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 7
 ttttagttta tgtatgtgt ttttg 25

<210> 8
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> PCR引物

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 人工序列的描述: PCR引物

 <400> 8
 aacacataca taaactaaaa atgactaaat ctgagcagca a 41

 <210> 9
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> PCR引物

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 人工序列的描述: PCR引物

 <400> 9
 atgatgatga tgatgatgac ctgctaagta gctcagtaa 39

 <210> 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> PCR引物

 <220>
 <221> misc feature
 <223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 10 catcatcatc atcatcatta aataagaacc cacgct	36
<210> 11 <211> 30 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 共有MetR受体序列	
<220> <221> misc_feature <223> 人工序列的描述: 共有MetR受体序列	
<400> 11 gttaatgttg aacaaatctc atggtgcgtg	30
<210> 12 <211> 35 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR引物	
<220> <221> misc feature <223> 人工序列的描述: PCR引物	
<400> 12 gcgggtcgac tatgactaaa tctgagcagc aagcc	35
<210> 13 <211> 31 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR引物	

<220>

<221> misc_feature

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 13

gcgtgcggcc gcgttatgct aagtagctca g 31

<210> 14

<211> 1524

<212> DNA

<213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

<400> 14

atgactaaat ctgagcagca agccgattca agacataacg ttatcgactt agttggtaac 60

acccattga tcgcactgaa aaaattgcct aaggcttgg gtatcaaacc acaaattat 120

gctaagctgg aactatacaa tccagtggt tccatcaaag acagaattgc caagtctatg 180

gtggaagaag ctgaagcttc cggtagaatt catcctcca gatctactct gatcgaacct 240

acttctgga acaccggat cggtctagct ttaatcggcg ccatcaaagg ttacagaact 300

atcatcacct tgcggaaaa aatgtctaac gagaaagtt ctgtcctaaa ggctctgggt 360

gctgaaatca tcagaactcc aactgctgct gctgggatt ctccagaatc acatattggt 420

gttgctaaga agttggaaaa agagattcct ggtgctgta tacttgacca atataacaat 480

atgatgaacc cagaagctca ttactttggt actggtcgcg aaatcaaag acagctagaa 540

gacttgaatt tattgataa tctacgcgct gttgttctg gtgctggtac tgggtggact 600

attagcggta ttccaagta ctgaaagaa cagaatgata agatccaaat cgttggtgct 660

gagggattcg gtcaatttt agcccaacct gaaaactga ataagactga tatcactgac 720

tacaaagttg agggatttgg ttatgatttt gttcctcagg tttggacag aaaattaat 780

gatgtttggt ataagacaga cgacaagcct tcttcaaata acgccagaca attgatttct 840

aacgaagggt tcttgggtgg tggttcttc gttctacct tctctcgggt tgtgaaatac 900

tgtgaagacc acctgaact gactgaagat gatgtcattg ttgcatatt cccagattcc 960

atcagtcgt acctaaccaa attcgtgat gacgaatggt tgaaaaagaa caatttgg 1020

gatgatgacg tgttgcccg tttgactct tcaaagctgg aggcttcgac gacaaaatac 1080
gctgatgtgt ttgtaacgc tactgtaaag gatcttcact tgaaaccggt tgtttccgtt 1140
aaggaaaccg ctaaggcac tgatgttacc aagatattaa aagacaatgg ctttgaccaa 1200
ttgcctgtgt tgactgaaga cggcaagtg tctggtttag ttactctctc tgagcttcta 1260
agaaaactat caatcaataa ttcaaacaac gacaacacta taaagggtaa atacttgac 1320
ttcaagaaat taaacaattt caatgatgtt tcctcttaca acgaaaataa atccggttaag 1380
aagaagtta ttaaattcga tgaaaactca aagctatctg acttgaatcg ttctttgaa 1440
aaaaactcat ctgccgttat cactgatggc ttgaaaccaa tccatctctg tactaagatg 1500
gatttactga gctacttagc ataa 1524

<210> 15
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> PCR引物

<220>
<221> misc feature
<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 15
ctatatcgta ataatgacta aatctgagca gcaagccgat tca 43

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> PCR引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 16
agggctcgag gatcccgggg gtgctattat gaatgcacgg 40

<210> 17
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> PCR引物

<220>
<221> misc_feature
<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 17
cggggatccg acgtttgcc cgcaggcggg aaacc 35

<210> 18
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> PCR引物

<220>
<221> misc feature
<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 18
agatttagtc attattacga tatagttaat agttgatag 39

<210> 19
<211> 428
<212> PRT
<213> 大肠杆菌 *Escherichia coli*)

<400> 19

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1 5 10 15
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30
 Pro Met Ala Asp Lys Lys Leu Asp Thr Gln Leu Val Asn Ala Gly Arg
 35 40 45
 Ser Lys Lys Tyr Thr Leu Gly Ala Val Asn Ser Val Ile Gln Arg Ala
 50 55 60
 Ser Ser Leu Val Phe Asp Ser Val Glu Ala Lys Lys His Ala Thr Arg
 65 70 75 80
 Asn Arg Ala Asn Gly Glu Leu Phe Tyr Gly Arg Arg Gly Thr Leu Thr
 85 90 95
 His Phe Ser Leu Gln Gln Ala Met Cys Glu Leu Glu Gly Gly Ala Gly
 100 105 110
 Cys Val Leu Phe Pro Cys Gly Ala Ala Ala Val Ala Asn Ser Ile Leu
 115 120 125
 Ala Phe Ile Glu Gln Gly Asp His Val Leu Met Thr Asn Thr Ala Tyr
 130 135 140
 Glu Pro Ser Gln Asp Phe Cys Ser Lys Ile Leu Ser Lys Leu Gly Val
 145 150 155 160
 Thr Thr Ser Trp Phe Asp Pro Leu Ile Gly Ala Asp Ile Val Lys His
 165 170 175
 Leu Gln Pro Asn Thr Lys Ile Val Phe Leu Glu Ser Pro Gly Ser Ile
 180 185 190
 Thr Met Glu Val His Asp Val Pro Ala Ile Val Ala Ala Val Arg Ser

195 200 205
 Val Val Pro Asp Ala Ile Ile Met Ile Asp Asn Thr Trp Ala Ala Gly
 210 215 220

Val Leu Phe Lys Ala Leu Asp Phe Gly Ile Asp Val Ser Ile Gln Ala
 225 230 235 240

Ala Thr Lys Tyr Leu Val Gly His Ser Asp Ala Met Ile Gly Thr Ala
 245 250 255

Val Cys Asn Ala Arg Cys Trp Glu Gln Leu Arg Glu Asn Ala Tyr Leu
 260 265 270

Met Gly Gln Met Val Asp Ala Asp Thr Ala Tyr Ile Thr Ser Arg Gly
 275 280 285

Leu Arg Thr Leu Gly Val Arg Leu Arg Gln His His Glu Ser Ser Leu
 290 295 300

Lys Val Ala Glu Trp Leu Ala Glu His Pro Gln Val Ala Arg Val Asn
 305 310 315 320

His Pro Ala Leu Pro Gly Ser Lys Gly His Glu Phe Trp Lys Arg Asp
 325 330 335

Phe Thr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Ser Phe Val Leu Lys Lys Lys Leu
 340 345 350

Asn Asn Glu Glu Leu Ala Asn Tyr Leu Asp Asn Phe Ser Leu Phe Ser
 355 360 365

Met Ala Tyr Ser Trp Gly Gly Tyr Glu Ser Leu Ile Leu Ala Asn Gln
 370 375 380

Pro Glu His Ile Ala Ala Ile Arg Pro Gln Gly Glu Ile Asp Phe Ser

385 390 395 400
 Gly Thr Leu Ile Arg Leu His Ile Gly Leu Glu Asp Val Asp Asp Leu
 405 410 415

 Ile Ala Asp Leu Asp Ala Gly Phe Ala Arg Ile Val
 420 425

 <210> 20
 <211> 1252
 <212> PRT
 <213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

 <400> 20

 Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60

 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80

 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Glu Val Leu
 210 215 220

Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Met Thr
 225 230 235 240

Lys Ser Glu Gln Gln Ala Asp Ser Arg His Asn Val Ile Asp Leu Val
 245 250 255

Gly Asn Thr Pro Leu Ile Ala Leu Lys Lys Leu Pro Lys Ala Leu Gly
 260 265 270

Ile Lys Pro Gln Ile Tyr Ala Lys Leu Glu Leu Tyr Asn Pro Gly Gly
 275 280 285

Ser Ile Lys Asp Arg Ile Ala Lys Ser Met Val Glu Glu Ala Glu Ala
 290 295 300

Ser Gly Arg Ile His Pro Ser Arg Ser Thr Leu Ile Glu Pro Thr Ser
 305 310 315 320

Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ile Gly Ala Ile Lys Gly Tyr
325 330 335

Arg Thr Ile Ile Thr Leu Pro Glu Lys Met Ser Asn Glu Lys Val Ser
340 345 350

Val Leu Lys Ala Leu Gly Ala Glu Ile Ile Arg Thr Pro Thr Ala Ala
355 360 365

Ala Trp Asp Ser Pro Glu Ser His Ile Gly Val Ala Lys Lys Leu Glu
370 375 380

Lys Glu Ile Pro Gly Ala Val Ile Leu Asp Gln Tyr Asn Asn Met Met
385 390 395 400

Asn Pro Glu Ala His Tyr Phe Gly Thr Gly Arg Glu Ile Gln Arg Gln
405 410 415

Leu Glu Asp Leu Asn Leu Phe Asp Asn Leu Arg Ala Val Val Ala Gly
420 425 430

Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ile Ser Gly Ile Ser Lys Tyr Leu Lys Glu
435 440 445

Gln Asn Asp Lys Ile Gln Ile Val Gly Ala Asp Pro Phe Gly Ser Ile
450 455 460

Leu Ala Gln Pro Glu Asn Leu Asn Lys Thr Asp Ile Thr Asp Tyr Lys
465 470 475 480

Val Glu Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Val Pro Gln Val Leu Asp Arg Lys
485 490 495

Leu Ile Asp Val Trp Tyr Lys Thr Asp Asp Lys Pro Ser Phe Lys Tyr
500 505 510

Aia Arg Gln Leu Ile Ser Asn Glu Gly Val Leu Val Gly Gly Ser Ser
515 520 525

Gly Ser Ala Phe Thr Ala Val Val Lys Tyr Cys Glu Asp His Pro Glu
530 535 540

Leu Thr Glu Asp Asp Val Ile Val Ala Ile Phe Pro Asp Ser Ile Arg
545 550 555 560

Ser Tyr Leu Thr Lys Phe Val Asp Asp Glu Trp Leu Lys Lys Asn Asn
565 570 575

Leu Trp Asp Asp Asp Val Leu Ala Arg Phe Asp Ser Ser Lys Leu Glu
580 585 590

Ala Ser Thr Thr Lys Tyr Ala Asp Val Phe Gly Asn Ala Thr Val Lys
595 600 605

Asp Leu His Leu Lys Pro Val Val Ser Val Lys Glu Thr Ala Lys Val
610 615 620

Thr Asp Val Ile Lys Ile Leu Lys Asp Asn Gly Phe Asp Gln Leu Pro
625 630 635 640

Val Leu Thr Glu Asp Gly Lys Leu Ser Gly Leu Val Thr Leu Ser Glu
645 650 655

Leu Leu Arg Lys Leu Ser Ile Asn Asn Ser Asn Asn Asp Asn Thr Ile
660 665 670

Lys Gly Lys Tyr Leu Asp Phe Lys Lys Leu Asn Asn Phe Asn Asp Val
675 680 685

Ser Ser Tyr Asn Glu Asn Lys Ser Gly Lys Lys Lys Phe Ile Lys Phe
690 695 700

Asp Glu Asn Ser Lys Leu Ser Asp Leu Asn Arg Phe Phe Glu Lys Asn
705 710 715 720

Ser Ser Ala Val Ile Thr Asp Gly Leu Lys Pro Ile His Ile Val Thr
 725 730 735

Lys Met Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Ala Met Thr Lys Ser Glu Gln Gln
 740 745 750

Ala Asp Ser Arg His Asn Val Ile Asp Leu Val Gly Asn Thr Pro Leu
 755 760 765

Ile Ala Leu Lys Lys Leu Pro Lys Ala Leu Gly Ile Lys Pro Gln Ile
 770 775 780

Tyr Ala Lys Leu Glu Leu Tyr Asn Pro Gly Gly Ser Ile Lys Asp Arg
785 790 795 800

Ile Ala Lys Ser Met Val Glu Glu Ala Glu Ala Ser Gly Arg Ile His
 805 810 815

Pro Ser Arg Ser Thr Leu Ile Glu Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile
 820 825 830

Gly Leu Ala Leu Ile Gly Ala Ile Lys Gly Tyr Arg Thr Ile Ile Thr
 835 840 845

Leu Pro Glu Lys Met Ser Asn Glu Lys Val Ser Val Leu Lys Ala Leu
 850 855 860

Gly Ala Glu Ile Ile Arg Thr Pro Thr Ala Ala Ala Trp Asp Ser Pro
865 870 875 880

Glu Ser His Ile Gly Val Ala Lys Lys Leu Glu Lys Glu Ile Pro Gly
 885 890 895

Ala Val Ile Leu Asp Gln Tyr Asn Asn Met Met Asn Pro Glu Ala His
 900 905 910

Tyr Phe Gly Thr Gly Arg Glu Ile Gln Arg Gln Leu Glu Asp Leu Asn
 915 920 925

Leu Phe Asp Asn Leu Arg Ala Val Val Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly
 930 935 940

Thr Ile Ser Gly Ile Ser Lys Tyr Leu Lys Glu Gln Asn Asp Lys Ile
 945 950 955 960

Gln Ile Val Gly Ala Asp Pro Phe Gly Ser Ile Leu Ala Gln Pro Glu
 965 970 975

Asn Leu Asn Lys Thr Asp Ile Thr Asp Tyr Lys Val Glu Gly Ile Gly
 980 985 990

Tyr Asp Phe Val Pro Gln Val Leu Asp Arg Lys Leu Ile Asp Val Trp
 995 1000 1005

Tyr Lys Thr Asp Asp Lys Pro Ser Phe Lys Tyr Ala Arg Gln Leu
 1010 1015 1020

Ile Ser Asn Glu Gly Val Leu Val Gly Gly Ser Ser Gly Ser Ala
 1025 1030 1035

Phe Thr Ala Val Val Lys Tyr Cys Glu Asp His Pro Glu Leu Thr
 1040 1045 1050

Glu Asp Asp Val Ile Val Ala Ile Phe Pro Asp Ser Ile Arg Ser
 1055 1060 1065

Tyr Leu Thr Lys Phe Val Asp Asp Glu Trp Leu Lys Lys Asn Asn
 1070 1075 1080

Leu Trp Asp Asp Asp Val Leu Ala Arg Phe Asp Ser Ser Lys Leu
 1085 1090 1095

Glu Ala Ser Thr Thr Lys Tyr Ala Asp Val Phe Gly Asn Ala Thr
 1100 1105 1110

Val Lys Asp Leu His Leu Lys Pro Val Val Ser Val Lys Glu Thr
 1115 1120 1125

Ala Lys Val Thr Asp Val Ile Lys Ile Leu Lys Asp Asn Gly Phe
 1130 1135 1140

Asp Gln Leu Pro Val Leu Thr Glu Asp Gly Lys Leu Ser Gly Leu
 1145 1150 1155

Val Thr Leu Ser Glu Leu Leu Arg Lys Leu Ser Ile Asn Asn Ser
 1160 1165 1170

Asn Asn Asp Asn Thr Ile Lys Gly Lys Tyr Leu Asp Phe Lys Lys
 1175 1180 1185

Leu Asn Asn Phe Asn Asp Val Ser Ser Tyr Asn Glu Asn Lys Ser
 1190 1195 1200

Gly Lys Lys Lys Phe Ile Lys Phe Asp Glu Asn Ser Lys Leu Ser
 1205 1210 1215

Asp Leu Asn Arg Phe Phe Glu Lys Asn Ser Ser Ala Val Ile Thr
 1220 1225 1230

Asp Gly Leu Lys Pro Ile His Ile Val Thr Lys Met Asp Leu Leu
 1235 1240 1245

Ser Tyr Leu Ala
 1250

<210> 21
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 21
 atggcggaca aaaagcttga tactcaactg gtgaatgcag gacgcagcaa aaaatacact 60
 ctcggcgcgg taaatagcgt gattcagcgc gcttcttcgc tggctttga cagtgtagaa 120
 gccaaaaaac acgcgacacg taatcgcgcc aatggagagt tgtctatgg acggcgcgga 180
 acgtaaccc atttctcctt acaacaagcg atgtgtgaac tggaagggtg cgcaggctgc 240
 gtgctatttc cctgcggggc ggcagcgggt gctaattcca ttcttgcttt tatcgaacag 300
 ggcgatcatg tgttgatgac caacaccgcc tatgaaccga gtcaggattt ctgtagcaaa 360
 atcctcagca aactgggcgt aacgacatca tggttgatc cgctgattgg tgccgatatc 420
 gtaagcatc tgcagccaaa cactaaaate gtgtttctgg aatgccagg ctccatcacc 480
 atggaagtcc acgacgttcc ggcgattgtt gccgccgtac gcagtgtggt gccggatgcc 540
 atcattatga tcgacaacac ctgggcagcc ggtgtgctgt ttaaggcgtt ggattttggc 600
 atcgatgttt ctattcaagc cgccacaaa tatctggtt ggcatcaga tgcgatgatt 660
 ggcaactgcc tgtgcaatgc ccgttgctgg gacgagctac gggaaaatgc ctatctgatg 720
 ggcagatgg tcgatgccga taccgctat ataaccagcc gtggcctgcg cacattaggt 780
 gtgcgtttgc gtcaacatca tgaaagcagt ctgaaagtgg ctgaatggct ggcagaacat 840
 ccgcaagttg cgcgagttaa ccacctgct ctgcctggca gtaaaggta cgaattctgg 900
 aaacgagact ttacaggcag cagcgggcta tttcctttg tgcttaagaa aaaactcaat 960
 aatgaagagc tggcgaacta tctggataac tcagtttat tcagcatggc ctactcgtgg 1020
 ggccgggatg aatcgttgat cctggcaaat caaccagaac atatcgccgc cattcggcca 1080
 caaggcgaga tcgattttag cgggacctg attcgcctgc atattggtct ggaagatgct 1140
 gacgatctga ttccgatct ggacccgggt ttgcccga ttgtataa 1188

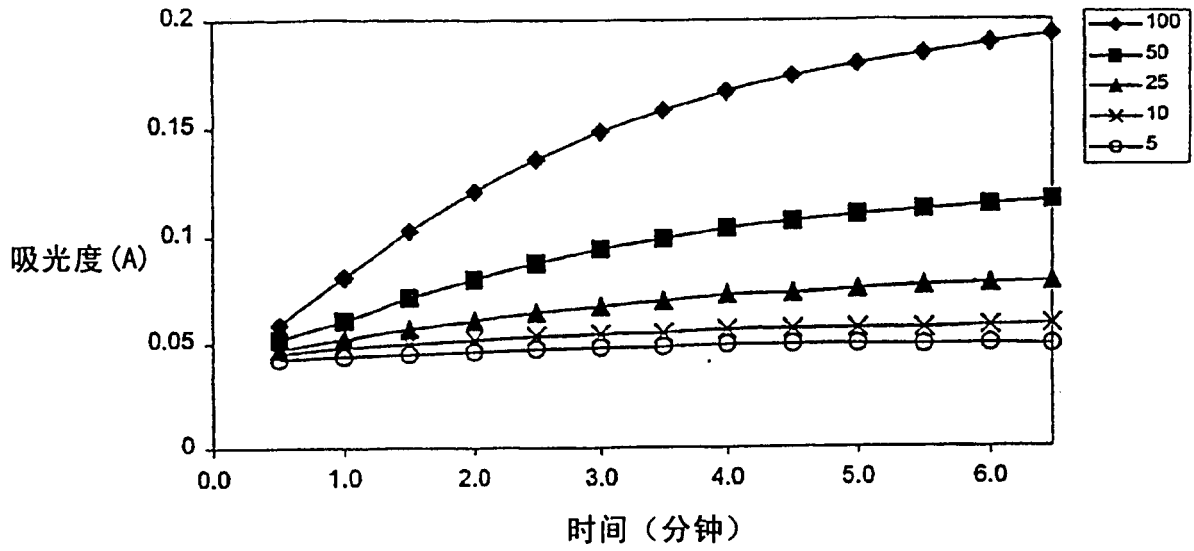


图 1

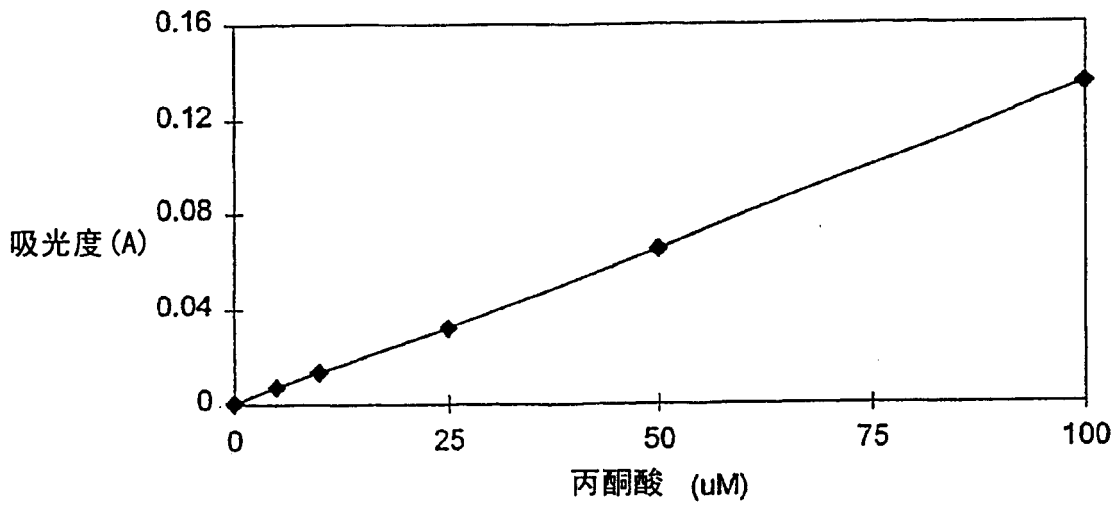


图 2

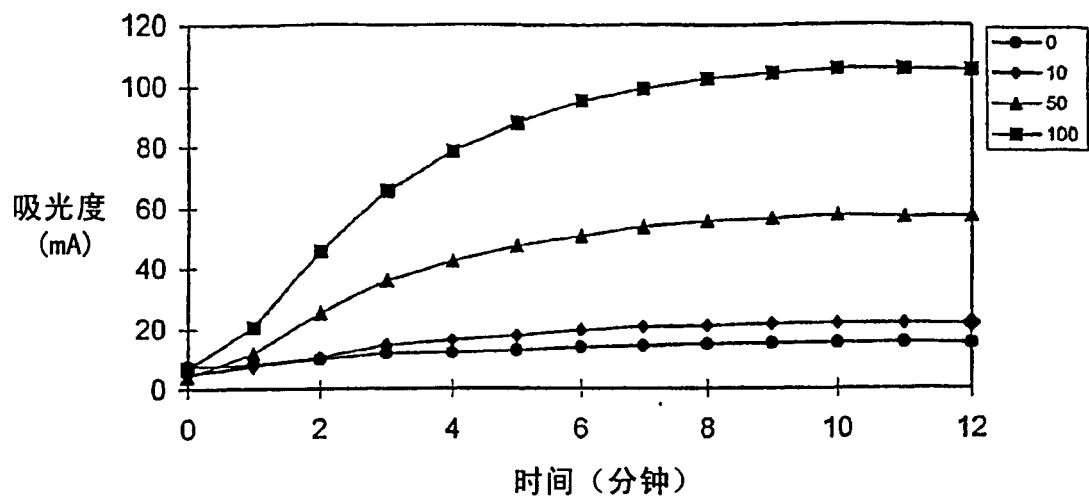


图 3

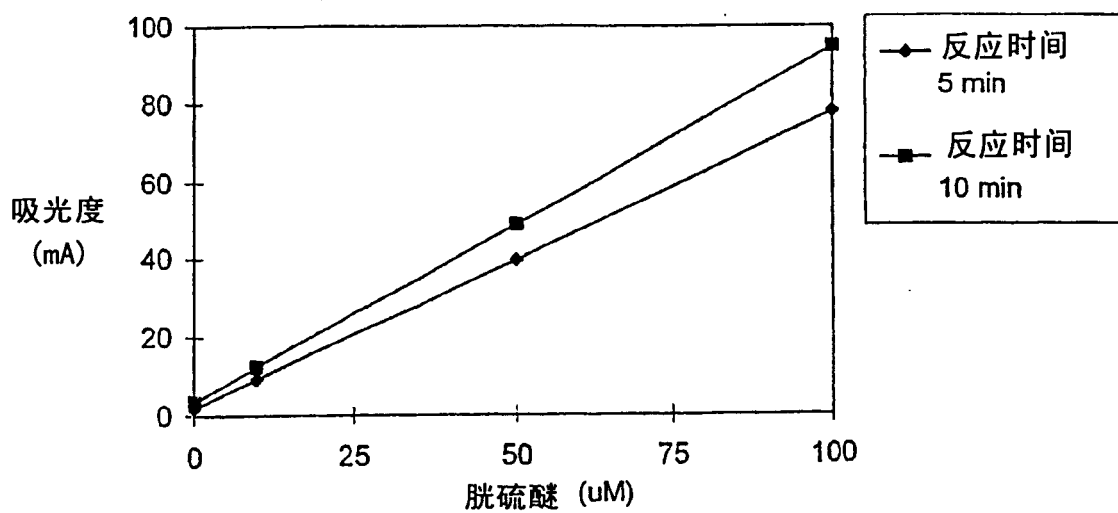


图 4

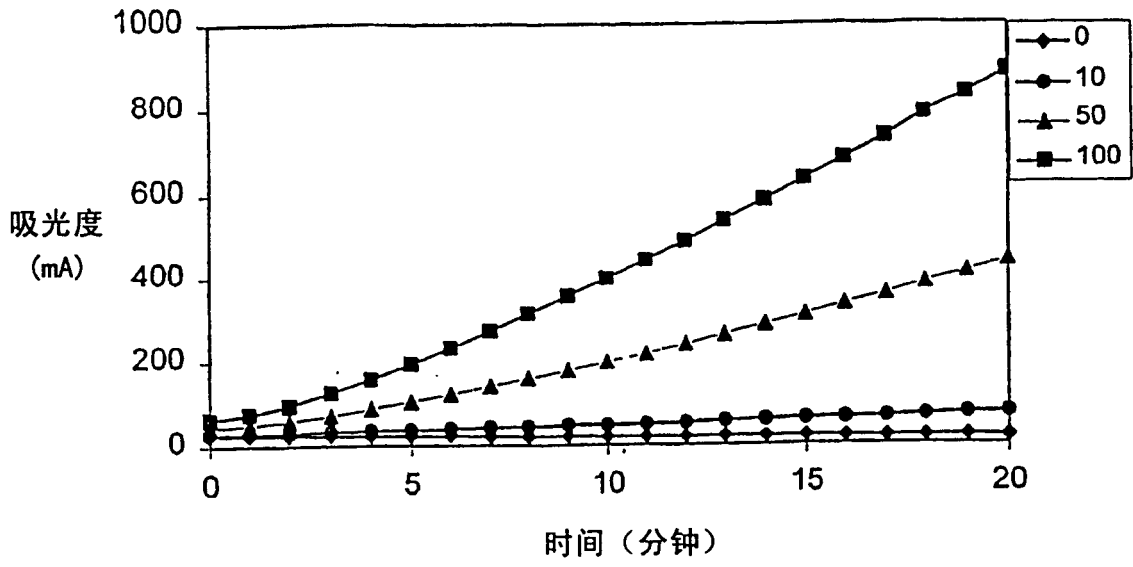


图 5

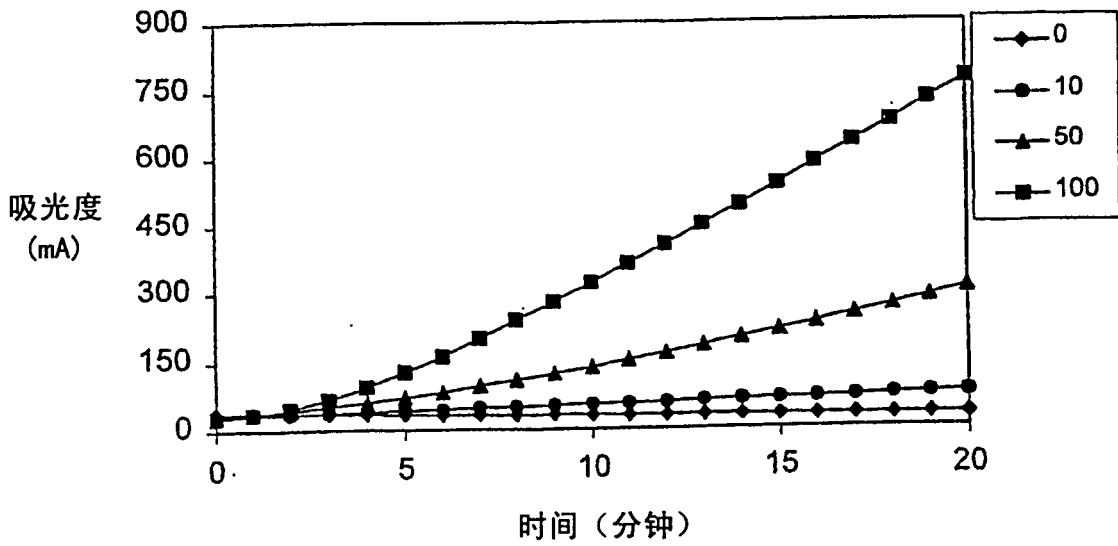


图 6

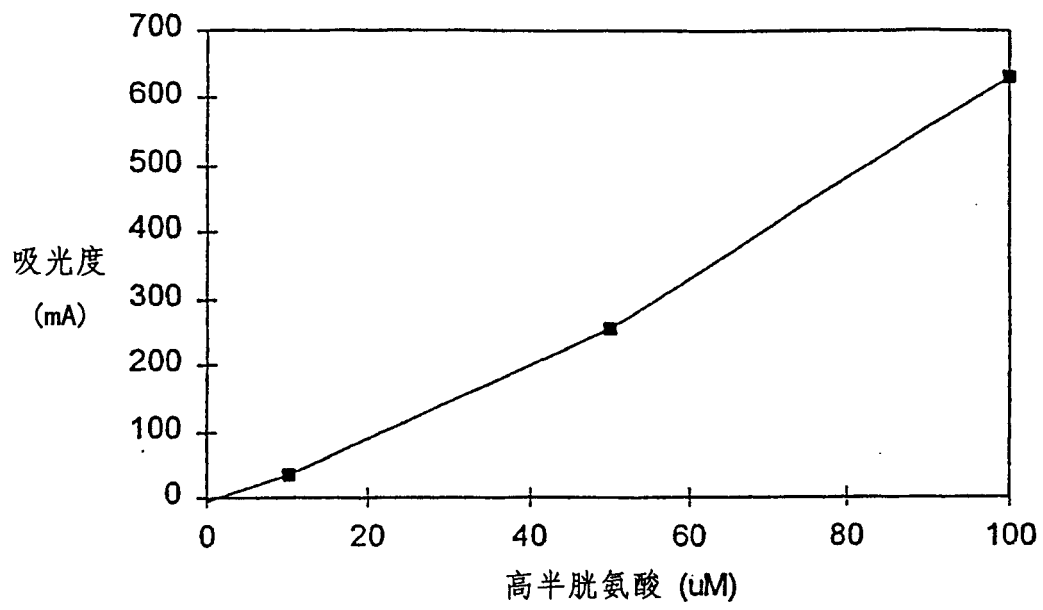


图 7

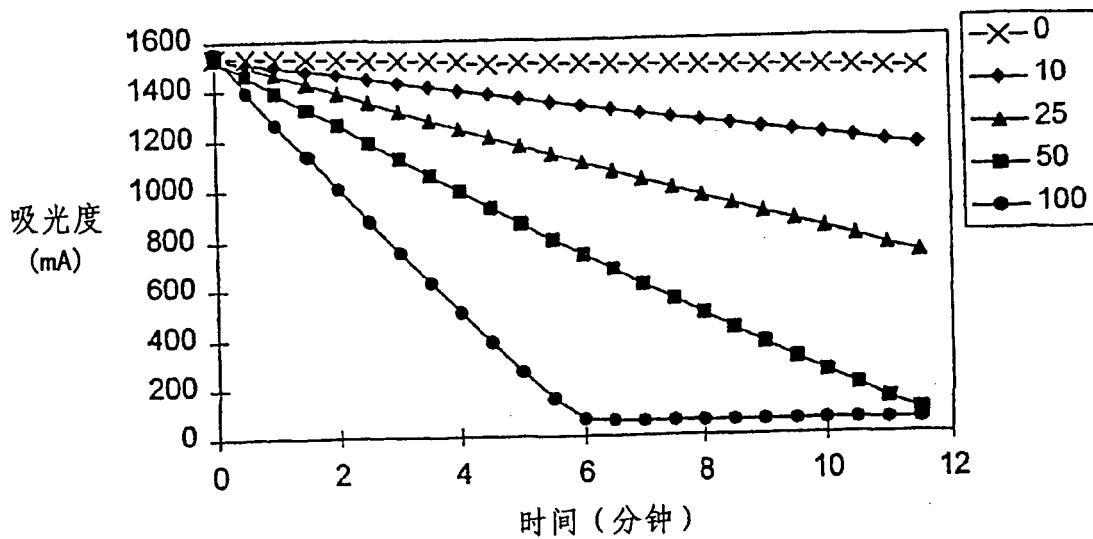


图 8

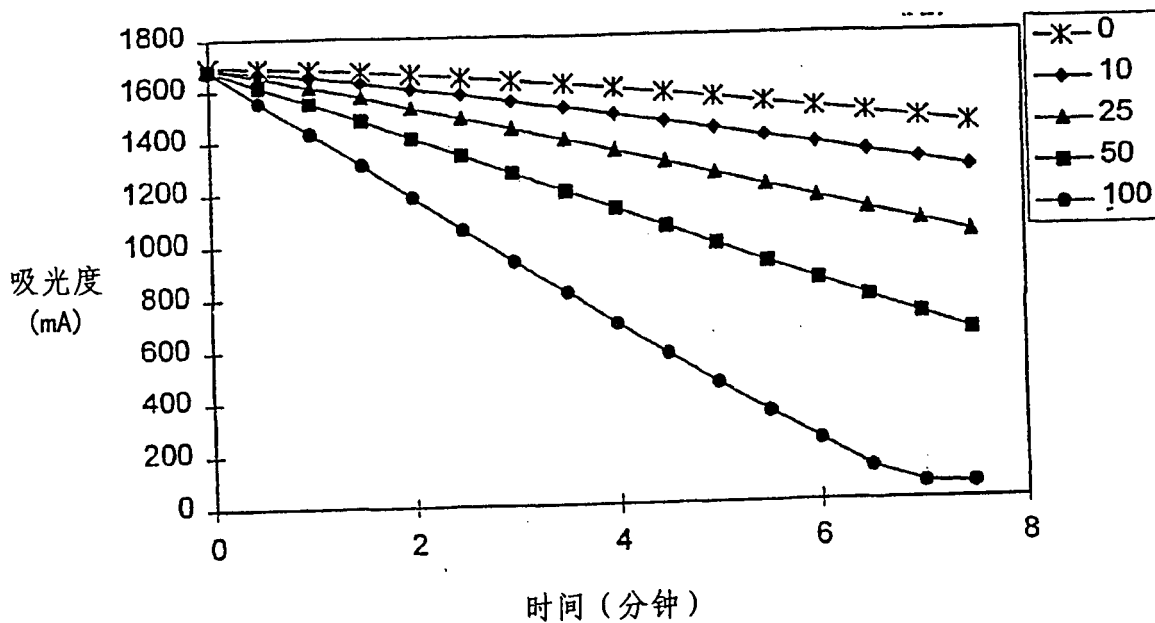


图 9

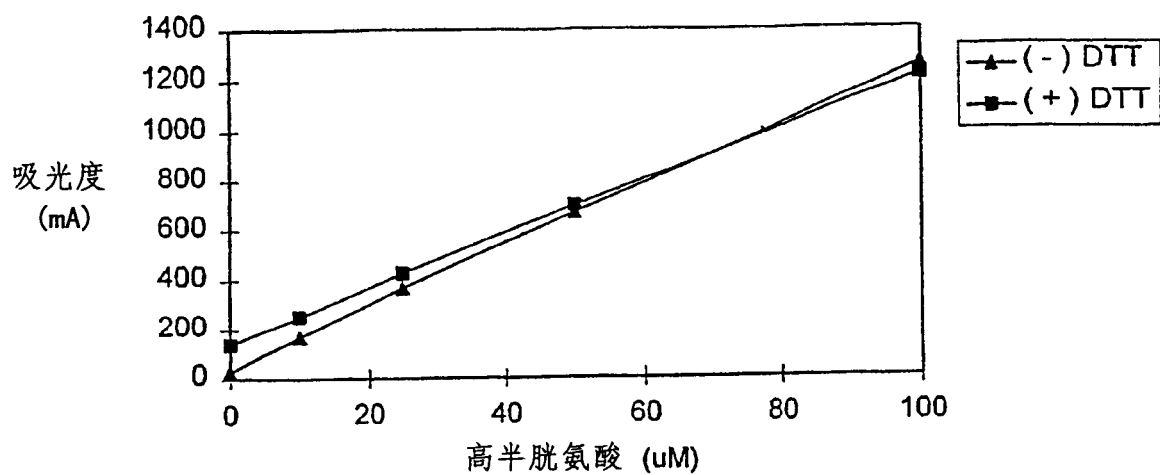


图 10

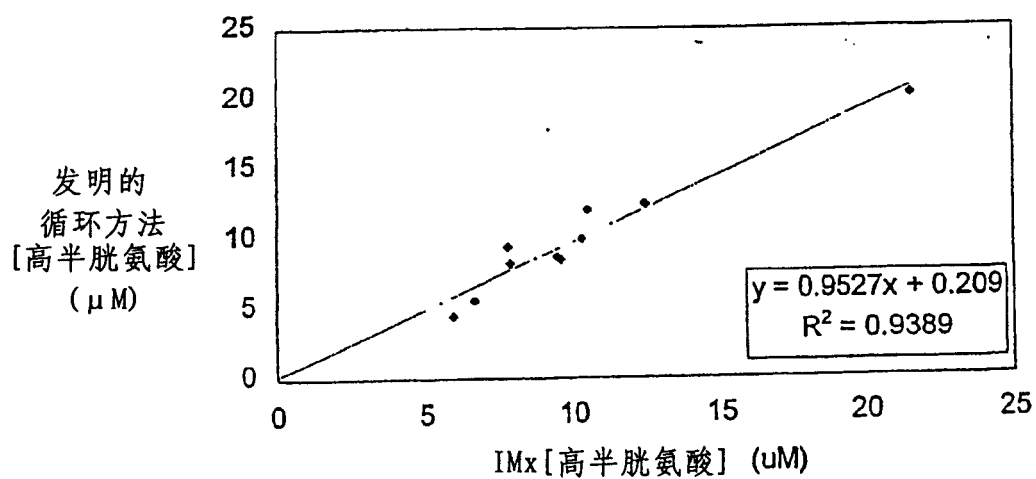


图 11

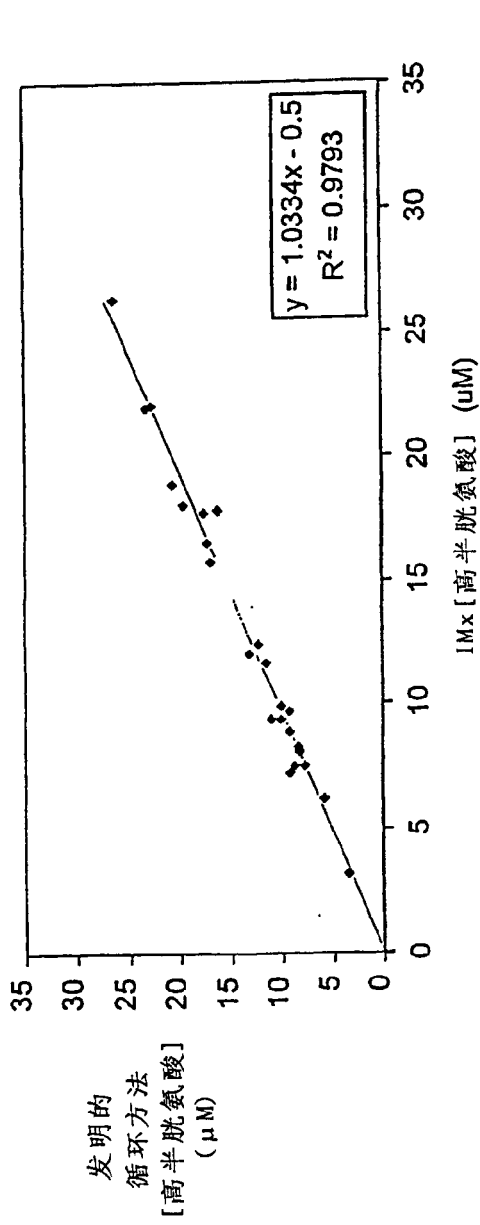


图 12

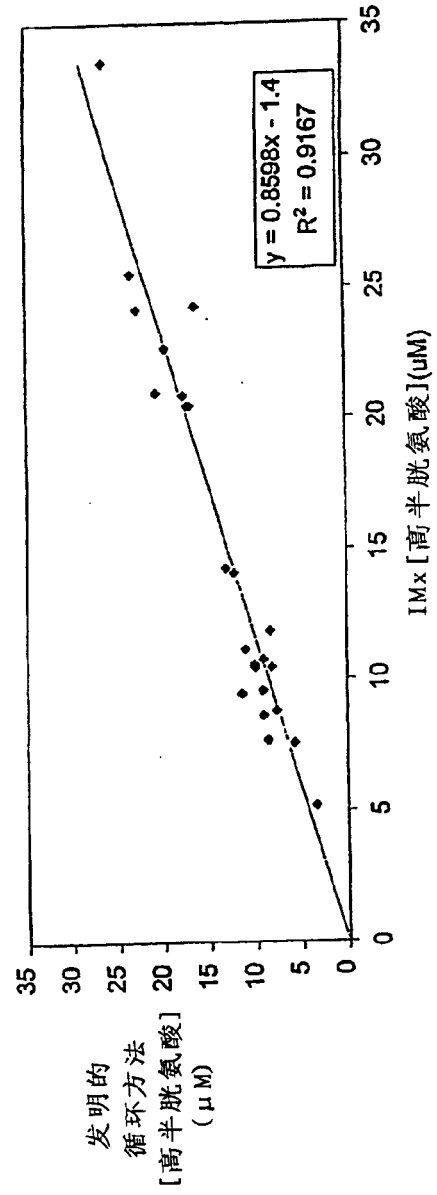


图 13

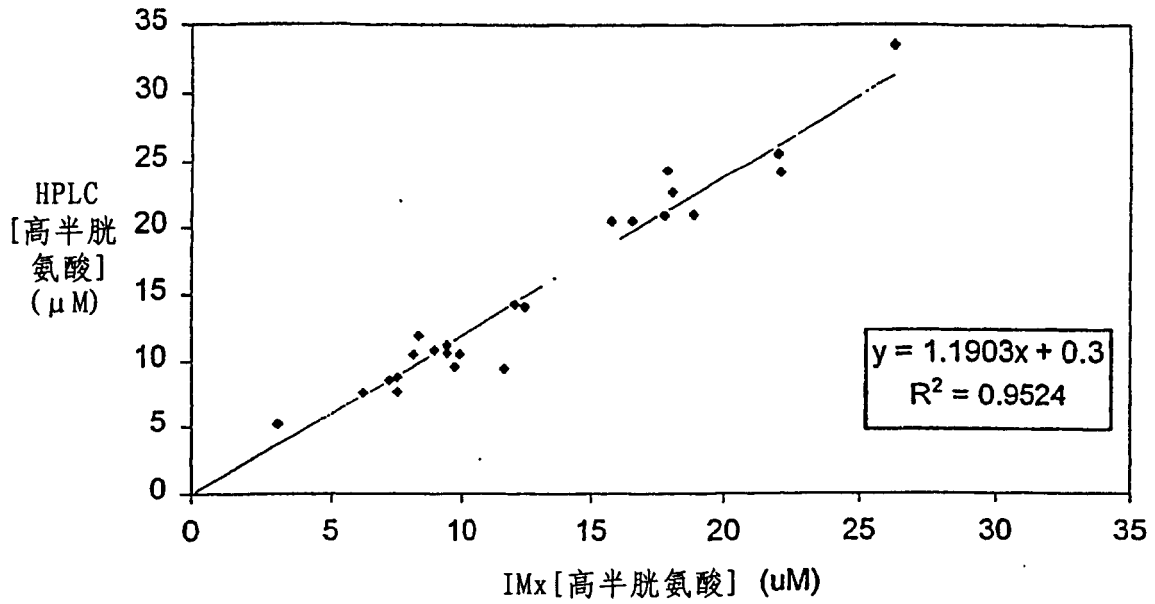


图 14

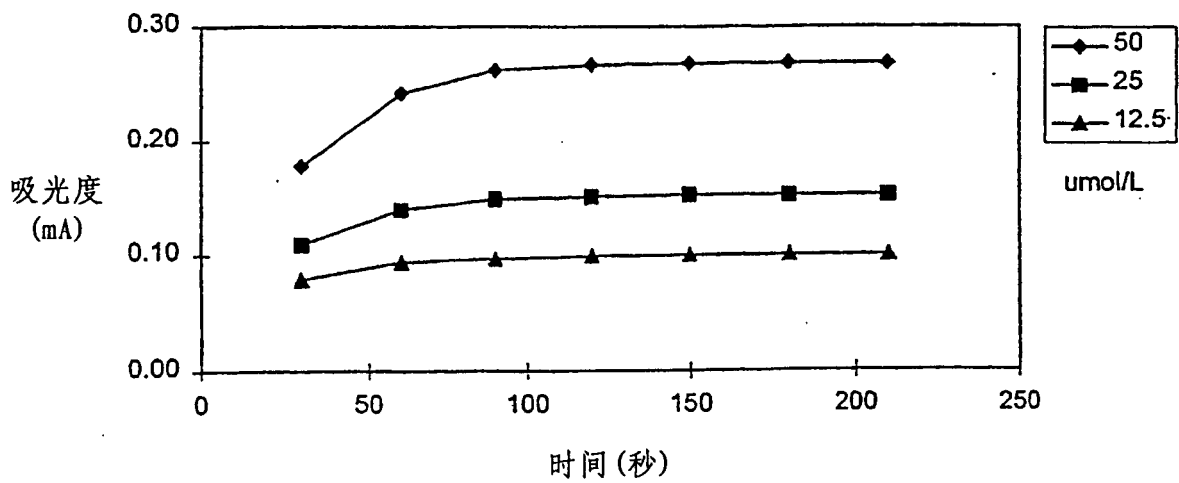


图 15

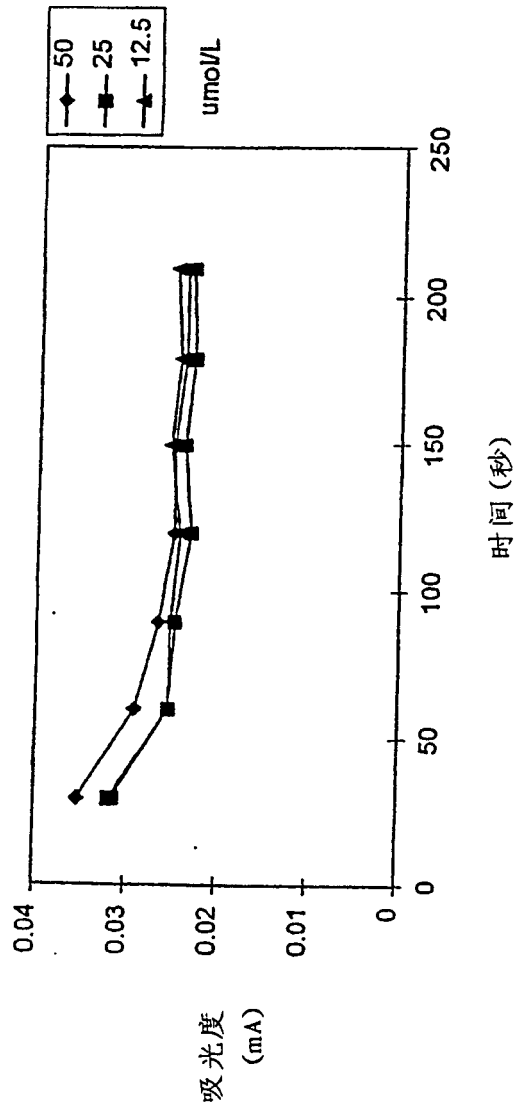


图 16

专利名称(译)	用于高半胱氨酸和胱硫醚的酶促循环测定		
公开(公告)号	CN1612937A	公开(公告)日	2005-05-04
申请号	CN02826808.3	申请日	2002-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	凯奇股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	凯奇股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	凯奇股份有限公司		
[标]发明人	HK韦伯 J欧文斯 R里德克 D弗里斯特 M莱加兹 G川崎 S罗森		
发明人	H·K·韦伯 J·欧文斯 R·里德克 D·弗里斯特 M·莱加兹 G·川崎 S·罗森		
IPC分类号	C12Q1/00 C12N9/00 C12N15/52 C12Q1/26 C12Q1/32 C12Q1/527 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6815 C12Q1/26 C12Q1/32 Y10S435/975 Y10S435/968 C12Q1/527		
代理人(译)	周承泽		
优先权	10/012762 2001-11-06 US		
其他公开文献	CN1612937B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供酶促循环测定用于评估溶液中高半胱氨酸和/或胱硫醚的量，如血液、血液衍生物或尿。测定包括步骤：含高半胱氨酸和/或胱硫醚溶液接触CBS或其衍生物、L-丝氨酸和CBL或其衍生物以形成反应混合物，接触时间足以催化高半胱氨酸形式循环转变成胱硫醚且胱硫醚再转变成高半胱氨酸并产生丙酮酸和氨；确定反应混合物中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量；在形成的丙酮酸和/或氨量的基础上确定溶液中存在的高半胱氨酸和/或胱硫醚的量。也提供CBS或其衍生物和CBL或其衍生物的表达载体和分离过程以及进行测定的测试试剂盒。在较佳实施方案中，测定可用最少的酶在15分钟或更少进行中。

