



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872205 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810619580.0

(22)申请日 2018.06.19

(71)申请人 深圳上泰生物工程有限公司

地址 518000 广东省深圳市光明新区光明
街道观光路3009号光明科技园A1栋9
楼

(72)发明人 陈小茹 吴向东

(74)专利代理机构 深圳市世纪恒程知识产权代
理事务所 44287

代理人 胡海国

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

目标物含量检测方法以及检测试剂在该检测方法中的应用

(57)摘要

本发明提供一种目标物含量检测方法,包括将样本S1与酶循环试剂接触,经预设时间T1得到中间样本S2;然后向中间样本S2中加入发光试剂得到发光的中间样本S3,并测定中间样本S3的发光信号强度;再基于预先建立的所述发光信号强度与第一底物浓度的关联模型,确定样本S1中的第一底物浓度。此外,本发明还提供一种检测试剂在目标物含量检测方法中的应用。本发明通过合理的设计,将酶循环法和化学发光法巧妙地联合,既放大了检测信号浓度,又能借助化学发光法灵敏响应 H_2O_2 信号,使检测灵敏度提高到埃摩尔水平,极大地提高了临床体外诊断检测的精准率,解决了目前市场上缺乏有效地实现埃摩尔水平样本生化 and 化学发光检测方法的现状。

1. 一种目标物含量检测方法, 其特征在于, 所述目标物含量检测方法包括:

步骤1. 将样本S1与酶循环试剂接触, 使酶循环试剂与样本S1中的第一底物发生酶循环反应, 并生成 H_2O_2 , 经预设时间T1得到中间样本S2;

步骤2. 向中间样本S2中加入发光试剂得到发光的中间样本S3, 并测定中间样本S3的发光信号强度, 其中, 所述发光试剂包括发光底物, 所述发光底物能与 H_2O_2 反应并发光;

步骤3. 基于预先建立的所述发光信号强度与第一底物浓度的关联模型, 确定样本S1中的第一底物浓度, 其中, 所述目标物包括第一底物。

2. 根据权利要求1所述的目标物含量检测方法, 其特征在于, 所述酶循环试剂包括第一循环酶、第一辅助底物、第二循环酶和第二辅助底物, 所述使酶循环试剂与样本S1中的第一底物发生酶循环反应, 并生成 H_2O_2 包括:

步骤1-1. 使第一底物在第一循环酶的催化下与第一辅助底物反应生成循环底物;

步骤1-2. 使循环底物在第二循环酶的催化下与第二辅助底物反应重新生成第一底物, 并返回步骤1;

其中, 步骤1-1或步骤1-2还生成 H_2O_2 。

3. 根据权利要求2所述的目标物含量检测方法, 其特征在于,

所述第一循环酶为芳香醇氧化酶AAO, 第一辅助底物为氧化态的黄素腺嘌呤二核苷酸FAD, 第二循环酶为芳香醇脱氢酶AAD, 第二辅助底物为还原态的黄素腺嘌呤二核苷酸FADH,

所述第一底物为 $Ar-CH_2OH$, 其中, Ar为取代或未取代的苯基,

通过所述步骤1-1生成 H_2O_2 和循环底物 $Ar-CHO$ 。

4. 根据权利要求1所述的目标物含量检测方法, 其特征在于, 所述发光底物包括吖啶酯、吖啶酯衍生物、鲁米诺和鲁米诺衍生物中的一种或多种。

5. 根据权利要求1所述的目标物含量检测方法, 其特征在于, 所述检测方法还包括:

在步骤1前, 将样本S0与转化试剂接触, 经预设时间T0得到含第一底物的样本S1, 其中, 所述转化试剂选自化学试剂、酶试剂或酶免疫试剂, 所述第一底物是待测物的化学转化产物、酶促反应产物或酶免疫反应中的酶促反应产物;

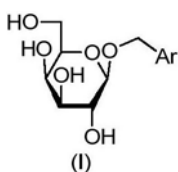
在步骤3后, 基于预先建立的所述发光信号强度与待测物浓度的关联模型、或基于预先建立的所述第一底物浓度与待测物浓度的关联模型, 确定样本S0中的待测物浓度, 其中, 所述目标物还包括待测物; 或者, 将步骤3替换为, 基于预先建立的所述发光信号强度与待测物浓度的关联模型, 确定样本S0中的待测物浓度, 其中, 所述目标物为待测物。

6. 根据权利要求5所述的目标物含量检测方法, 其特征在于,

所述转化试剂为以待测物为抗原的克隆酶供体免疫检测CEDIA试剂, 所述CEDIA试剂包括: 酶受体EA、被酶供体ED标记的抗原、能与抗原或ED标记的抗原发生特异性结合的抗体, 以及第二底物, 所述第二底物能被克隆酶催化反应生成第一底物。

7. 根据权利要求6所述的目标物含量检测方法, 其特征在于,

所述克隆酶为 β -D-半乳糖苷酶, 所述第二底物为下式(I)所示的 β -D-半乳糖苷化合物,



其中,Ar为取代或未取代的苯基,

所述 β -D-半乳糖苷酶催化 β -D-半乳糖苷化合物发生水解反应,得到 α -D-半乳糖和Ar-CH₂OH,所述Ar-CH₂OH为第一底物。

8.一种检测试剂在目标物含量检测方法中的应用,其特征在于,所述检测试剂应用于如权利要求1至7任一项所述的目标物含量检测方法,所述检测试剂包括:酶循环试剂和发光试剂。

9.根据权利要求8所述的检测试剂在目标物含量检测方法中的应用,其特征在于,所述检测试剂应用于如权利要求5至7任一项所述的目标物含量检测方法,所述检测试剂还包括:转化试剂。

目标物含量检测方法以及检测试剂在该检测方法中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及检测分析领域,具体涉及目标物含量检测方法以及检测试剂在该检测方法中的应用。

背景技术

[0002] 克隆酶供体免疫检测(Cloned Enzyme Donor Immunoassay, CEDIA)技术是通过测定酶活力来测定样本中抗原浓度的一项常规诊断技术,如图1所示,该方法的原理为:样本中的抗原和ED标记的抗原与抗体特异性竞争结合形成两种抗原抗体复合物。ED标记的抗原和抗体结合后,由于空间位阻,不再能与EA结合。反应平衡后,剩余的ED标记抗原和EA结合形成具有活性的 β -D-半乳糖苷酶。加入底物测定酶的活力,酶活力的大小与样本中抗原浓度成正比,从而测定样本中抗原的浓度;其中,ED和EA分别是利用DNA重组技术制备 β -D-半乳糖苷酶的两个片段:大片段称为酶受体(Enzyme Acceptor, EA),小片段称为酶供体(Enzyme Donor, ED),分开的两个酶片段本身均无酶活性,但在合适条件下结合在一起就具有酶活性,可以水解 β -D-半乳糖苷类化合物的糖苷键,生成 α -D-半乳糖和对应的片段。CEDIA方法适用于微摩尔 μ M下的样本检测,但是对于抗原浓度低于纳摩尔(nM)的微量样本检测,由于灵敏度不够,该方法无法满足测定要求。

[0003] 目前,在微量样本检测领域,酶循环法技术和化学发光免疫分析技术是体外诊断试剂研发中常用的两大核心技术平台。酶循环法(Enzymatic Cycling Methods)是采用两种工具酶进行的循环反应,使被检物信号放大扩增,然后通过UV等常规检测手段检测信号吸光度或其变化,从而提高检测灵敏度的酶学方法。化学发光免疫分析(Chemiluminescence Immunoassay, CLIA)则是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,通过将化学发光物质标记在抗原或抗体上,在免疫反应结束后,加入氧化剂使化学发光物质被氧化发光,从而通过测定发光信号强度测定样本中待测物的含量,由于其高灵敏度特性,可作为检测试剂应用于对微量(如皮摩尔pM浓度)标记物的体外诊断中。但对于灵敏度要求更高(如埃摩尔aM水平)的标记物的体外诊断试剂,酶循环法技术和化学发光免疫法技术均无法满足其技术要求。

发明内容

[0004] 为了解决现有检测试剂在目标物极微量时难以有效检测其含量的不足,本发明的目的在于提供一种灵敏度更高的目标物含量检测方法和以及一种检测试剂在该检测方法中的应用,能够适用于埃摩尔aM水平的微量目标物的检测。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供了一种目标物含量检测方法,该目标物含量检测方法包括:

[0006] 步骤1.将样本S1与酶循环试剂接触,使酶循环试剂在第一底物参与下发生酶循环反应,并不断生成和累积 H_2O_2 ,经预设时间T1得到中间样本S2,

[0007] 步骤2.向中间样本S2中加入发光试剂得到发光的中间样本S3,并测定中间样本S3

的发光信号强度,其中,所述发光试剂包括发光底物,所述发光底物能与 H_2O_2 反应并反光;

[0008] 步骤3.基于预先建立的所述发光信号强度与第一底物浓度的关联模型,确定样本S1中的第一底物浓度,其中,所述目标物包括第一底物。

[0009] 可选地,该酶循环试剂包括第一循环酶、第一辅助底物、第二循环酶和第二辅助底物,

[0010] 所述使酶循环试剂在第一底物参与下发生酶循环反应,并不断生成和累积 H_2O_2 ,具体包括:

[0011] 步骤1-1.使第一底物在第一循环酶的催化下与第一辅助底物反应生成循环底物,

[0012] 步骤1-2.使循环底物在第二循环酶的催化下与第二辅助底物反应重新生成第一底物,并返回步骤1;

[0013] 其中,步骤1-2或步骤2-2还生成 H_2O_2 。

[0014] 可选地,该酶循环试剂的第一循环酶为芳香醇氧化酶AAO,第一辅助底物为氧化态的黄素腺嘌呤二核苷酸FAD,第二循环酶为芳香醇脱氢酶AAD,第二辅助底物为还原态的黄素腺嘌呤二核苷酸FADH,

[0015] 所述第一底物为 $Ar-CH_2OH$,其中Ar为取代或未取代的苯基,

[0016] 具体地,循环反应的步骤为,首先 $Ar-CH_2OH$ 在AAO催化下与FAD反应生成循环底物 $Ar-CHO$ 和 H_2O_2 ,然后, $Ar-CHO$ 在AAD催化下与FADH反应重新生成 $Ar-CH_2OH$ 完成第一轮循环,新生成的 $Ar-CH_2OH$ 继续参与下一轮循环。

[0017] 可选地,所述发光底物选自吖啶酯、吖啶酯衍生物、鲁米诺或鲁米诺衍生物的一种或多种的混合。

[0018] 可选地该目标物含量检测方法还包括:

[0019] 在步骤1前,将样本S0与转化试剂接触,经预设时间T0得到含第一底物的样本S1,其中,所述转化试剂选自化学试剂、酶试剂或酶免疫试剂,能分别使样本S0中的待测物发生化学转化、酶催化或酶免疫反应,所述第一底物是待测物的化学转化产物、酶促反应产物或酶免疫反应中的酶促反应产物;

[0020] 在步骤3后,基于预先建立的所述发光信号强度与待测物浓度的关联模型,或基于预先建立的所述的第一底物浓度与待测物浓度的关联模型,确定样本S0中的待测物浓度,其中,所述目标物还包括待测物;或者将步骤3替换为,基于预先建立的所述发光信号强度与待测物浓度的关联模型,确定样本S0中的待测物浓度,其中,所述目标物为待测物。

[0021] 可选地,所述转化试剂为以待测物为抗原的克隆酶供体免疫检测CEDIA试剂,所述CEDIA试剂包括:酶受体EA、被酶供体ED标记的抗原、能与抗原或ED标记的抗原发生特异性结合的抗体,以及第二底物,所述第二底物能被克隆酶催化反应生成第一底物。

[0022] 可选地,所述酶免疫反应包括:

[0023] 使待测物和ED标记的抗原与抗体特异性结合,发生免疫反应;

[0024] 使免疫反应中未反应完的ED标记的抗原与EA结合形成具有酶活力的克隆酶;

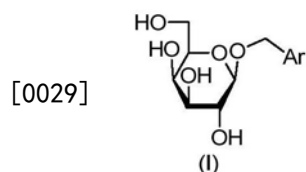
[0025] 使第二底物在克隆酶催化下发生酶促反应生成第一底物。

[0026] 可选地,所述待测物和ED标记的抗原与抗体特异性结合既可以在一个体系中同时发生,即竞争性的,也可以在一个体系中先后发生,即非竞争性的,还可以是二者的组合。

[0027] 可选地,所述使待测物和ED标记的抗原与抗体特异性结合,具体包括:先使待测物

与抗体混合并发生免疫反应,然后向其中加入ED标记的抗原,使ED标记的抗原与尚未与待测物结合的抗体发生免疫反应。

[0028] 可选地,所述克隆酶为 β -D-半乳糖苷酶,所述第二底物为下式(I)所示的 β -D-半乳糖苷化合物,



[0030] 其中,Ar为取代或未取代的苯基,

[0031] 所述 β -D-半乳糖苷酶催化 β -D-半乳糖苷化合物发生水解反应,得到 α -D-半乳糖和 $\text{Ar-CH}_2\text{OH}$,所述 $\text{Ar-CH}_2\text{OH}$ 为第一底物。

[0032] 可选地,所述取代或未取代的苯基中所述的取代是指被下列一个或多个取代基取代:氟、氯、溴、碘、羟基、氨基、伯胺基、仲胺基、硝基、亚硝基、氰基、 $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ 烷基或 $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ 烷氧基,其中,

[0033] 所述 $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ 烷基包括甲基、乙基、丙基,异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、1-甲基丙基;

[0034] 所述 $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ 烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基,异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、1-甲基丙氧基;

[0035] 可选地,所述发光信号强度与待测物浓度的关联模型,发光信号强度与第一底物浓度的关联模型或第一底物浓度与待测物浓度的关联模型,是以标准曲线形式提供的。

[0036] 可选地,所述目标物为抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素或药物。

[0037] 为了实现上述目的,本发明还提供一种检测试剂在目标物含量检测方法中的应用,该检测试剂包括:酶循环试剂和发光试剂,其中,

[0038] 所述酶循环试剂在第一底物参与下发生酶循环反应,并在循环反应中产生和累积 H_2O_2 ;

[0039] 所述发光试剂包括发光底物,能与 H_2O_2 反应并发光。

[0040] 可选地,所述酶循环试剂包括第一循环酶、第一辅助底物、第二循环酶和第二辅助底物,

[0041] 所述第一底物在第一循环酶的催化下与第一辅助底物发生氧化还原反应生成循环底物,并且所述循环底物在第二循环酶的催化下与第二辅助底物发生氧化还原反应重新生成第一底物,完成一轮循环反应,其中,在所述生成循环底物或第一底物的同时,还生成 H_2O_2 ,新生成的第一底物可以继续参与下一轮循环反应。

[0042] 例如,当酶循环试剂为芳香醇氧化酶(AAO)/芳香醇脱氢酶(AAD)循环试剂时,所述第一循环酶为AAO,所述第一辅助底物为氧化态的黄素腺嘌呤二核苷酸FAD,所述第二循环酶为AAD,所述第二辅助底物为还原态的黄素腺嘌呤二核苷酸FADH,参见图2,当所述第一底物为对甲氧基苯甲醇时,对甲氧基苯甲醇在AAO催化下与FAD反应,被氧化成循环底物对甲氧基苯甲醛,并产生 H_2O_2 ,对甲氧基苯甲醛在AAD催化下与FADH反应又被还原回对甲氧基苯甲醇完成一轮循环反应,新生成的对甲氧基苯甲醇又可重新作为第一底物参与下一轮循环反应中。

[0043] 又例如,当酶循环试剂为甘油磷酸氧化酶(GPO)/甘油醛-3-磷酸脱氢酶 G_3PDH 酶循

环试剂时,所述第一循环酶为GPO,所述第一辅助底物为氧气,所述第二循环酶为3-磷酸甘油脱氢酶G₃PDH,所述第二辅助底物为还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NADH,当所述第一底物为三磷酸甘油G₃P时,G₃P在GPO催化下与氧气反应,被氧化成循环底物磷酸二羟丙酮,并产生H₂O₂,磷酸二羟丙酮在G₃PDH催化下与NADH反应又被还原回G₃P完成一轮循环反应,新生成的G₃P又可重新作为第一底物参与下一轮循环反应中。

[0044] 可选地,所述发光底物选自吖啶酯、吖啶酯衍生物、鲁米诺或鲁米诺衍生物的一种或多种的混合;

[0045] 可选地,该检测试剂还包括:转化试剂,所述转化试剂选自化学试剂、酶试剂或酶免疫试剂,其中,

[0046] 所述化学试剂能与待测物发生化学反应并生成第一底物;

[0047] 所述酶试剂能催化待测物发生酶催化反应并生成第一底物;

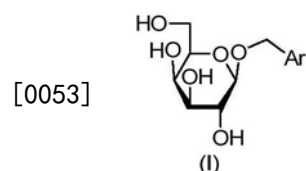
[0048] 所述酶免疫试剂能以酶标待测物作为抗原发生免疫反应,酶标待测物上的标记酶能催化待测物发生酶催化反应,从而生成第一底物,

[0049] 其中,所述目标物还包括待测物,或者所述目标物为待测物。

[0050] 可选地,所述转化试剂为以待测物为抗原的克隆酶供体免疫检测CEDIA试剂,所述CEDIA试剂包括:酶受体EA、被酶供体ED标记的抗原、能与抗原或ED标记的抗原发生特异性结合的抗体,以及第二底物,所述第二底物能被克隆酶催化反应生成第一底物。

[0051] 可选地,根据组分功能的不同,所述CEDIA试剂含有2个以上试剂包,其中,EA、ED标记的抗原分别位于不同的两个试剂包中,ED标记的抗原与抗体分别位于不同的两个试剂包中。

[0052] 可选地,所述克隆酶为 β -D-半乳糖苷酶,所述第二底物为下式(I)所示的 β -D-半乳糖苷化合物,



[0054] 其中,Ar为取代或未取代的苯基,

[0055] 所述 β -D-半乳糖苷酶催化 β -D-半乳糖苷化合物发生水解反应,得到 α -D-半乳糖和Ar-CH₂OH,所述Ar-CH₂OH为第一底物。

[0056] 可选地,所述取代或未取代的苯基中所述的取代是指被下列一个或多个取代基取代:氟、氯、溴、碘、羟基、氨基、伯胺基、仲胺基、硝基、亚硝基、氰基、C₁~C₄烷基或C₁~C₄烷氧基,其中,

[0057] 所述C₁~C₄烷基包括甲基、乙基、丙基,异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、1-甲基丙基;

[0058] 所述C₁~C₄烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基,异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、1-甲基丙氧基;

[0059] 可选地,该检测样本中目标物含量的试剂,包括

[0060] CEDIA试剂、AAO/AAD酶循环试剂和发光试剂,

[0061] 所述CEDIA试剂包括:试剂包1、试剂包2和试剂包3,其中,

[0062] 试剂包1包括抗体,还可以包括但不限于选自酶稳定剂、氯化钠、金属螯合剂和缓冲液中的至少一种;

[0063] 试剂包2包括前面所述的 β -D-半乳糖苷化合物、ED标记的抗原,还可以包括但不限于选自酶稳定剂、氯化钠、表面活性剂、防腐剂、缓冲液中的至少一种;

[0064] 试剂包3包括EA,还可以包括但不限于选自酶稳定剂、氯化钠、防腐剂和缓冲液;

[0065] 所述酶循环试剂包括:AAO、AAD、FADH、FAD;还可以包括但不限于选自酶稳定剂、缓冲液的至少之一;

[0066] 所述发光试剂包括前面所述的发光底物,还可以包括但不限于选自增溶剂和缓冲液的至少一种,其中,所述增溶剂可以是DMSO、DMF、THF、乙腈等有机溶剂。

[0067] 上述不同试剂或试剂包中,当含有缓冲液时,缓冲液的pH和缓冲盐可以相同或不同。

[0068] 本发明的有益效果

[0069] 通过设计巧妙的将酶循环法和化学发光法联合起来,利用酶循环法扩增 H_2O_2 使得检测信号放大,并借助化学发光法响应扩增的 H_2O_2 信号从而进一步提高检测试剂灵敏度,开拓性地使检测灵敏度提高到埃摩尔水平,极大地提高了临床体外诊断检测的精准率,解决了目前市场上缺乏有效地实现埃摩尔水平样本检测方法的现状,充分满足微量样本的临床检测需求。

[0070] 进一步地,使得当待测目标物由于极微量而导致经化学转化、酶促反应或酶免疫反应转化后的产物(即待检信号)微弱,难以通过吸光度等常规检测手段有效检测时,能够通过酶循环法和化学发光法联合扩增待检测信号,并通过测定发光强度替代测定待检信号吸光度而被有效地检出,且该检测方法能够适用广泛的目标物的检测,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0071] 图1为克隆酶供体免疫检测试剂检测样本中抗原含量的原理;

[0072] 图2为发明实施例7涉及的检测方法的步骤示意图;

[0073] 图3为本发明实施例7涉及的AAO/AAD酶循环反应示意图;

[0074] 图4为本发明实施例7涉及的发光强度值与待测物浓度关联曲线图;

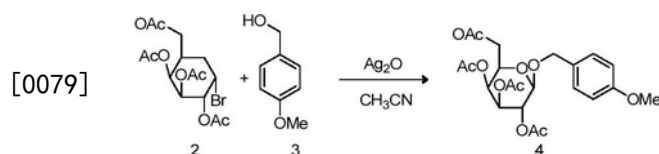
[0075] 图5为本发明实施例11涉及的不同T3浓度下发光强度值与循环时间关系曲线图。

具体实施方式

[0076] 首先为了便于了解本发明,以对甲氧基苄基- β -半乳糖苷的合成为例介绍 β -D-半乳糖苷化合物的通用合成方法:

[0077] 实施例1

[0078] 对甲氧基苄基- β -D-半乳糖苷的合成



[0080] 向装有对甲氧基苄醇(0.69g, 5mmol)和10mL乙腈的反应瓶中加入氧化银(1.39g,

6mmol), 室温下搅拌10分钟后, 加入2,3,4,6-O-四乙酰基- α -溴代半乳糖(2.06g, 5mmol), 反应混合物在室温下搅拌过夜。过滤除去固体, 减压除去乙腈, 加入10mL氯仿溶解, 先后用冷却的1N氢氧化钠、水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 然后减压除去有机溶剂, 利用正己烷/乙酸乙酯重结晶得到化合物对甲氧基苄基-(2,3,4,6-O-四乙酰基)- β -半乳糖苷1.9g (4.06mmol)。

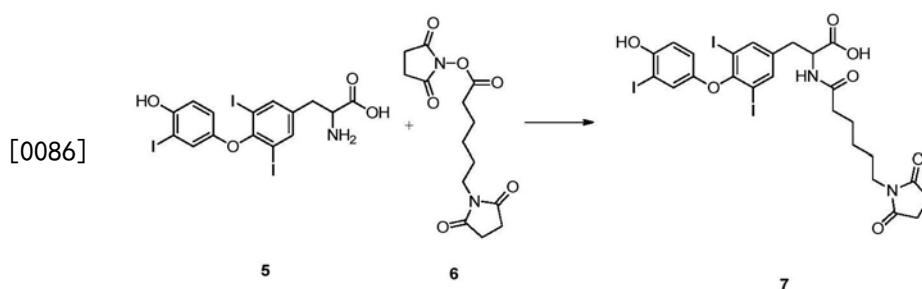


[0082] 将中间体化合物对甲氧基苄基-(2,3,4,6-O-四乙酰基)- β -半乳糖苷(1.9g, 4.06mmol)和10mL无水甲醇加入到干燥的反应容器中, 搅拌溶解, 并加入2mL 1N的无水甲醇钠的甲醇溶液充分混合, 室温搅拌1小时后, 用醋酸中和至PH约等于7.0。减压除去甲醇溶剂, 粗产物用乙酸乙酯/甲醇=10/1的洗脱液进行硅胶柱层析分离, 得到产物0.9g。

[0083] 需要说明的是本发明中其余 β -D-半乳糖苷化合物的制备方法可以采用类似以上的方案制备获得。

[0084] 实施例2

[0085] 3,3',5-三碘代-L-甲状腺原氨酸(T3)衍生物T3-EMCS的合成。



[0087] 将6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯EMCS(0.475g, 1.54mmol)溶解于二氯甲烷(5mL)中, 配置EMCS的二氯甲烷溶液备用,

[0088] 向装有3,3',5-三碘代-L-甲状腺原氨酸(T3)(1.0g, 1.54mmol)的反应容器中加入10mL二氯甲烷, 搅拌至T3完全溶解, 加入三乙胺(0.303g, 3.0mmol), 搅拌5分钟后, 向体系中滴加EMCS的二氯甲烷溶液。反应混合物在室温下搅拌2小时。减压除去有机溶剂, 粗产物经乙酸乙酯/甲醇=10/1的洗脱液进行硅胶柱层板分离纯化, 得产物T3-EMCS 0.8g。

[0089] 实施例3

[0090] T3-ED共价偶联物的制备

[0091] 将 β -D-半乳糖苷酶供体ED(2.0mg)溶解于1.0mL磷酸盐缓冲液(50mM, pH7.20)中得到ED溶液; 将实施例2制备得到的T3-EMCS(3.07mg)溶于100 μ L DMSO中得到T3-EMCS溶液; 将ED溶液和T3-EMCS溶液混合搅拌2小时后, 用Zeba脱盐离心柱除去过量的T3-EMCS, 得到纯化的T3-ED共价偶联物溶液(1.10mL, 1.65mg/mL)。

[0092] 实施例4

[0093] 克隆酶供体免疫检测试剂的制备

[0094] 将各组分混合配制试剂R1, 使其含有T3抗体(10 μ g/mL)、牛血清(0.001g/mL)、氯化钠(50mM)、EDTA:(1mM)、HEPES缓冲液(50mM, pH7.5);

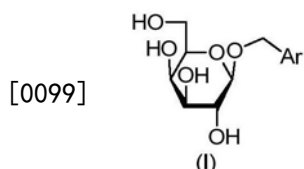
[0095] 将各组分混合配制试剂R2, 使其含有对甲氧基苄基 β -D-半乳糖苷(2mM)、牛血清

(0.005g/mL)、曲拉道X-100 (0.001g/mL)、叠氮化钠 (0.001g/mL)、HEPES缓冲液 (50mM, pH7.5) 和实施例3制备得到的T3-ED共价偶联物 (20uM) ;

[0096] 将各组分混合配制试剂R3,使其含有克隆酶受体EA (1mg/mL)、牛血清 (0.001g/mL)、氯化钠 (50mM)、叠氮化钠 (0.001g/mL) 和磷酸盐缓冲溶液 (50mM, pH7.5)。

[0097] 本实施例中,根据待测目标物的不同,例如抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素或药物,可替代的,制备具有不同ED标记的目标物和相应的CEDIA试剂。

[0098] 在本实施例中,对甲氧基苄基 β -D-半乳糖苷可以被下式 (I) 所示的 β -D-半乳糖苷化合物中任一化合物所替代,



[0100] 其中,Ar为取代或未取代的苯基,所述取代或未取代的苯基中所述的取代是指被下列一个或多个取代基取代:氟、氯、溴、碘、羟基、氨基、伯胺基、仲胺基、硝基、亚硝基、氰基、C1~C4烷基或C1~C4烷氧基,且当所述取代基为多个时,所述取代基相同或者不同。

[0101] 实施例5

[0102] 酶循环试剂R4的配制

[0103] 将各组分混合配制酶循环试剂R4,使其含有芳香醇氧化酶AAO (10U/mL)、

[0104] 芳香醇脱氢酶AAD (15U/mL)、FADH (1.5mM)、FAD (1.5mM)、牛血清 (0.001g/mL) 和HEPES缓冲液 (100mM, pH8.0)。

[0105] 实施例6

[0106] 发光试剂R5的配置

[0107] 将各组分混合配制发光试剂R5,使其含有吖啶酯 (50ug/mL)、DMSO (2g/mL) 和HEPES:缓冲液 (50mM, pH7.5)。

[0108] 实施例7

[0109] 校准曲线的建立

[0110] 分别配制浓度为1000am, 800am, 600am, 400am, 300am, 200am, 100am, 0am的T3校准品,对每一个校准品,分别进行下列操作:

[0111] 采用实施例4克隆酶供体免疫检测试剂 (试剂R1、R2、R3)、实施例5酶循环试剂R4和实施例6发光试剂R5;

[0112] 如图2所示,维持测试温度37℃下,分别取试剂R1 (100uL) 与不同校准品 (5uL) 充分混合5min,使T3抗原与抗体发生免疫反应;加入试剂R2 (50uL) 充分混合并反应5min,使T3-ED与未反应的抗体充分结合,再加入试剂R3 (50uL) 充分混合并反应5min,使EA与未反应的T3-ED充分结合形成活力酶,即 β -D-半乳糖苷酶,并进一步催化对甲氧基苄基 β -D-半乳糖苷水解生成 α -D-半乳糖和对甲氧基苄醇;充分搅拌下加入试剂R4 (50uL),使得生成的对甲氧基苄醇作为底物参与酶循环反应中,并在循环反应中不断生成H₂O₂,使H₂O₂信号扩增。循环反应特定时间,例如20min后,向循环反应体系中加入试剂R5 (20uL),使试剂R5中的发光底物吖啶酯与扩增信号H₂O₂反应发光,并在化学发光仪上记录化学发光强度值 (相对光单位RLU),结果如下表1所示。以校准品浓度为X轴,以发光值为Y轴,得到校准曲线,如图4所示。

[0113] 表1.不同浓度T3样本在酶循环20min后测得化学发光强度

[0114]

序号	浓度 (aM)	Intensity (RLU)	循环时间 (min)
1	0	190	20
2	100	510	20
3	200	790	20
4	300	1120	20
5	400	1530	20
6	600	2050	20
7	800	2540	20
8	1000	2910	20

[0115] 为了更具体的描述本实施例涉及的酶循环反应过程,参见图3,对甲氧基苯甲醇在AAO/FAD存在下被氧化成对甲氧基苯甲醛,并产生 H_2O_2 ,生成的对甲氧基苯甲醛在AAD/FADH存在下被还原回对甲氧基苯甲醇。从而形成一个循环体系,并不断产生出 H_2O_2 ,使 H_2O_2 累计升高。

[0116] 在本实施例中,在AAO、FAD、AAD、FADH和对甲氧基苯甲醇存在下,即可形成一个完整的酶循环系统,其中,将AAO设为第一循环酶、FAD设为第一辅助底物、AAD设为第二循环酶,FADH第二辅助底物,以及对甲氧基苯甲醇存设为第一底物时,它们的反应关系如下式(II)和下式(III)所示,

[0117] 首先,第一底物在第一循环酶的催化下与第一辅助底物反应生成循环底物,

[0118] 第一底物 + 第一辅助底物 $\xrightarrow{\text{第一循环酶}}$ 循环底物 (II)

[0119] 然后,使循环底物在第二循环酶的催化下与第二辅助底物反应重新生成第一底物,并返回式(II);

[0120] 循环底物 + 第二辅助底物 $\xrightarrow{\text{第二循环酶}}$ 第一底物 (III)

[0121] 其中,式(II)或式(III)还生成 H_2O_2 。

[0122] 本实施例中,当采用其它酶循环体系,例如,甘油磷酸氧化酶(GPO)/甘油醛-3-磷酸脱氢酶G₃PDH酶循环体系,只要能够同时符合式(II)和式(III)所示的反应模型并生成 H_2O_2 ,皆可采用本实施的方法测定酶循环体系中的第一底物浓度,并进一步获得与第一底物浓度关联的其它待测目标物的浓度。

[0123] 在本实施例中,吡啶酯可以替换为吡啶酯衍生物、鲁米诺或鲁米诺衍生物中的任意一种或它们中的多种的混合。

[0124] 对于不同的体系,循环反应时间可以依据检测灵敏度和精确度要求以及对检测效率的考虑,在较大幅度范围内具体确定,例如,还可以是10min、15min、25min、30min等。

[0125] 此外,试剂R1和试剂R2的加入顺序可以调整,使得T3和T3-ED与抗体特异性结合既可以在一个体系中同时发生,即竞争性的,也可以在一个体系中先后发生,即非竞争性的,还可以是二者的组合。

[0126] 在本实施例或本发明中,所述酶免疫反应包括:

[0127] 使待测物和ED标记的抗原与抗体特异性结合,发生免疫反应;

[0128] 使免疫反应中未反应完的ED标记的抗原与EA结合形成具有酶活力的克隆酶;

[0129] 使第二底物在克隆酶催化下发生酶促反应生成第一底物。

[0130] 实施例8

[0131] 基于酶循环-化学发光联合检测方法的样本浓度检测

[0132] 将未知浓度的待测样本与克隆酶供体免疫检测试剂接触,直到形成的克隆酶催化对甲氧基苄基- β -D-半乳糖苷水解反应预定时间(如5min)以后,向其中加入试剂R4 (50uL),使得水解产物对甲氧基苄醇进一步作为底物参与如图3所示酶循环反应中,并在循环反应中不断生成 H_2O_2 ,使 H_2O_2 信号扩增。循环反应20min后,向循环反应体系中加入试剂R5 (20uL),使试剂R5中吡啶酯与扩增信号 H_2O_2 反应发光,并在化学发光仪上记录化学发光强度(相对光单位RLU),利用实施例7建立的校准品曲线,如图4所示,可计算得到未知样本中的T3的浓度值。

[0133] 在本实施例中,通过采用具有ED标记的不同目标物制备得到的CEDIA试剂,该检测方法能够适用于广泛目标物浓度的检测,例如抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素或药物,具有广阔的应用前景。

[0134] 需要说明的是,本实施例中采用的CEDIA试剂,可被化学试剂、酶试剂或其它酶免疫试剂替换,通过化学转化、酶催化或酶免疫反应将待测物以一定的函数关系转换为可参与酶循环反应的底物,从而借助本实施例方法获得待测物的浓度。

[0135] 实施例9

[0136] 配置不同浓度对甲氧基苯甲醇的校准品,分别向其中加入试剂R4 (50uL),使得对甲氧基苯甲醇作为底物参与如图3所示酶循环反应中,并在循环反应中不断生成 H_2O_2 ,使 H_2O_2 信号扩增。25min后,向循环反应体系中加入试剂R5 (20uL),使试剂R5中的发光底物吡啶酯与扩增信号 H_2O_2 反应发光,并在化学发光仪上记录化学发光强度(相对光单位RLU),以校准品中对甲氧基苯甲醇浓度为X轴,以发光强度值为Y轴,得到对甲氧基苯甲醇浓度与发光强度值的关系曲线图。

[0137] 将待测样本中的待测物通过化学转化、酶免疫技术转化获得含对甲氧基苯甲醇化合物的新样本,其中,待测物浓度与新样本中的对甲氧基苯甲醇化合物浓度存在函数关联。向转化获得含对甲氧基苯甲醇化合物的新样本中加入试剂R4 (50uL),扩增信号。30min后,向循环反应体系中加入试剂R5 (20uL),并测定其发光强度,根据本实施预先建立的对甲氧基苯甲醇浓度与发光强度值的关系曲线图,计算新样本中的对甲氧基苯甲醇浓度。

[0138] 根据计算得到的对甲氧基苯甲醇浓度以及预先建立的待测物浓度与芳基醛化合物浓度的关联模型(可以是关系函数或关系曲线),计算得到最终的待测物浓度

[0139] 实施例10

[0140] 向未知浓度的对甲氧基苯甲醇化合物的新样本中加入试剂R4 (50uL),扩增信号。30min后,向循环反应体系中加入试剂R5 (20uL),并测定其发光强度,根据实施例9建立的对甲氧基苯甲醇浓度与发光强度值的关系曲线图,计算样本中的对甲氧基苯甲醇浓度。

[0141] 需要说明的是,采用本实施的方法,将未知浓度的对甲氧基苯醇化合物的新样本替换为未知浓度的对甲氧基苯甲醛化合物时,便可以用于测定对甲氧基苯甲醛的浓度,并且,进一步地,测定对象对甲氧基苯甲醛化合物还可以替换为其它单取代或多取代的芳基

甲醛化合物。

[0142] 此外,本实施例的检测方法所涉及的AAO/AAD酶循环体系可替代的还可同时适用于酶循环试剂为甘油磷酸氧化酶(GPO)/甘油醛-3-磷酸脱氢酶G3PDH酶循环体系,它们的共同特点是,在循环反应中,都可以通过每一轮循环生成 H_2O_2 并累积。

[0143] 实施例11

[0144] 灵敏度验证

[0145] 分别配制浓度为1000am,800am,600am,400am,300am,200am,100am,0am的T3标样,对每一个标样,分别进行下列操作:

[0146] 采用实施例4克隆酶供体免疫检测试剂(试剂R1、R2、R3)、实施例5酶循环试剂R4和实施例6发光试剂R5;

[0147] 如图2所示,维持测试温度 $37^{\circ}C$ 下,取试剂R1(100uL)与标样(5uL)充分混合,使T3抗原与抗体发生免疫反应5min;加入试剂R2(50uL)充分混合并反应5min,使T3-ED与未反应的抗体充分结合,再加入试剂R3(50uL)充分混合并反应5min,使EA与未反应的T3-ED充分结合形成活力酶,即 β -D-半乳糖苷酶,并进一步催化对甲氧基苄基 β -D-半乳糖苷水解生成 α -D-半乳糖和对甲氧基苄醇;充分搅拌下加入试剂R4(50uL),使得生成的对甲氧基苄醇作为底物参与酶循环反应中,并在循环反应中不断生成 H_2O_2 ,使 H_2O_2 信号扩增。在设定的循环反应时间点,向循环反应体系中加入试剂R5(20uL),使试剂R5中吖啶酯与扩增信号 H_2O_2 反应发光,并在化学发光仪上记录化学发光强度(相对光单位RLU)。

[0148] 分别测得浓度为400am,300am,200am,100am,0am的五个标样在不同时间的发光强度,结果如下表2所示。

[0149] 然后对所有标样的测定结果,以X轴为酶循环反应时间,Y轴为化学发光强度(RLU)作图,得到曲线图如图5所示。

[0150] 表2.不同浓度T3样本在特定不同酶循环时间点测得化学发光强度值

[0151]

时间 (min)	发光强度(RLU)				
	[T3]=100 aM	[T3]=200 aM	[T3]=300 aM	[T3]=400 aM	[T3]=0 aM
0	0	0	0	0	0
5	100	120	150	200	100
10	180	260	320	450	150
15	280	510	720	930	120
20	500	800	1100	1600	180
25	800	1200	1800	2500	190
30	1200	1800	2300	3100	160
35	1700	2300	3000	3600	140
40	2300	3000	3800	4500	130
45	2600	3500	4800	5500	200
50	2800	3800	5200	6000	220

[0152] 从表2和图5中,我们可以看出,就具体浓度的标样来说,随着循环反应时间延长,循环次数增加,发光强度越强,说明信号越好,测得的浓度值的精确度将越高,随着标样浓度的下降,当样本中T3浓度低至100aM时,仍能产生较高的信号发光,并被有效检测,说明将酶循环法和化学发光法结合起来可以进一步提高检测试剂的信号,使检测灵敏度达到埃摩尔水平。

[0153] 综上所述,本发明通过设计巧妙的将酶循环法和化学发光法联合起来,利用酶循环法扩增的 H_2O_2 浓度放大检测信号,借助化学发光法高灵敏度地响应 H_2O_2 信号,从而进一步提高检测试剂灵敏度,开拓性地使检测灵敏度提高到埃摩尔水平,极大地提高了临床体外诊断检测的精准率,解决了目前市场上缺乏有效地实现埃摩尔水平样本检测方法的现状,充分满足微量样本的临床检测需求。

[0154] 进一步地,使得当待测目标物由于极微量而导致经化学转化、酶促反应或酶免疫反应转化后的产物(即待检信号)微弱,难以通过吸光度等常规检测手段有效检测时,能够通过酶循环法和化学发光法联合扩增待检测信号,并通过测定发光强度替代测定待检信号吸光度而被有效地检出,且该检测方法能够适用广泛的目标物的检测,具有广阔的应用前景。

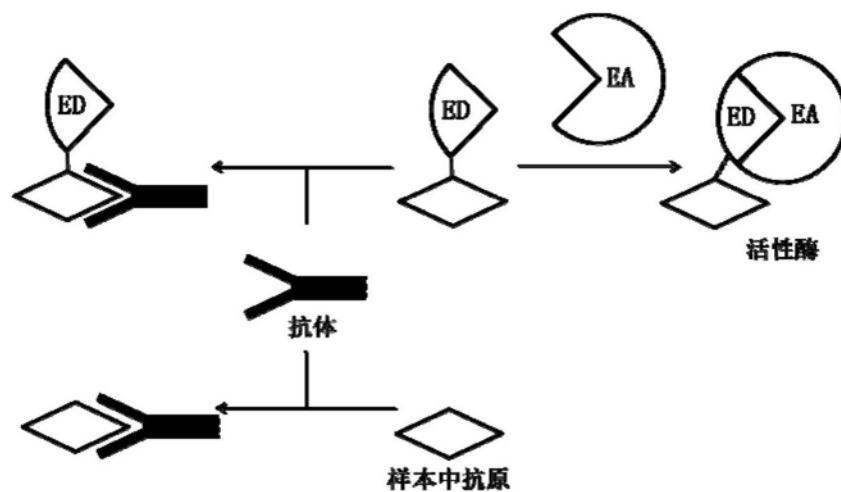


图1

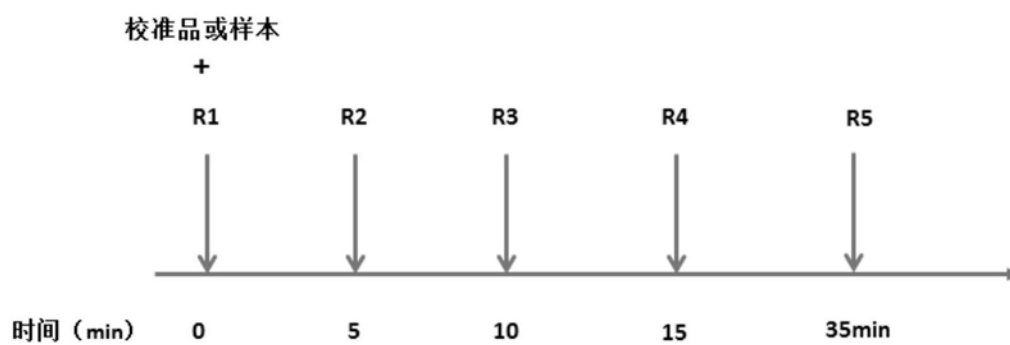


图2

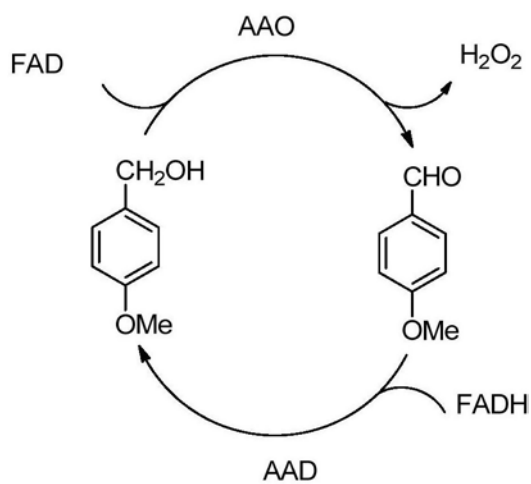


图3

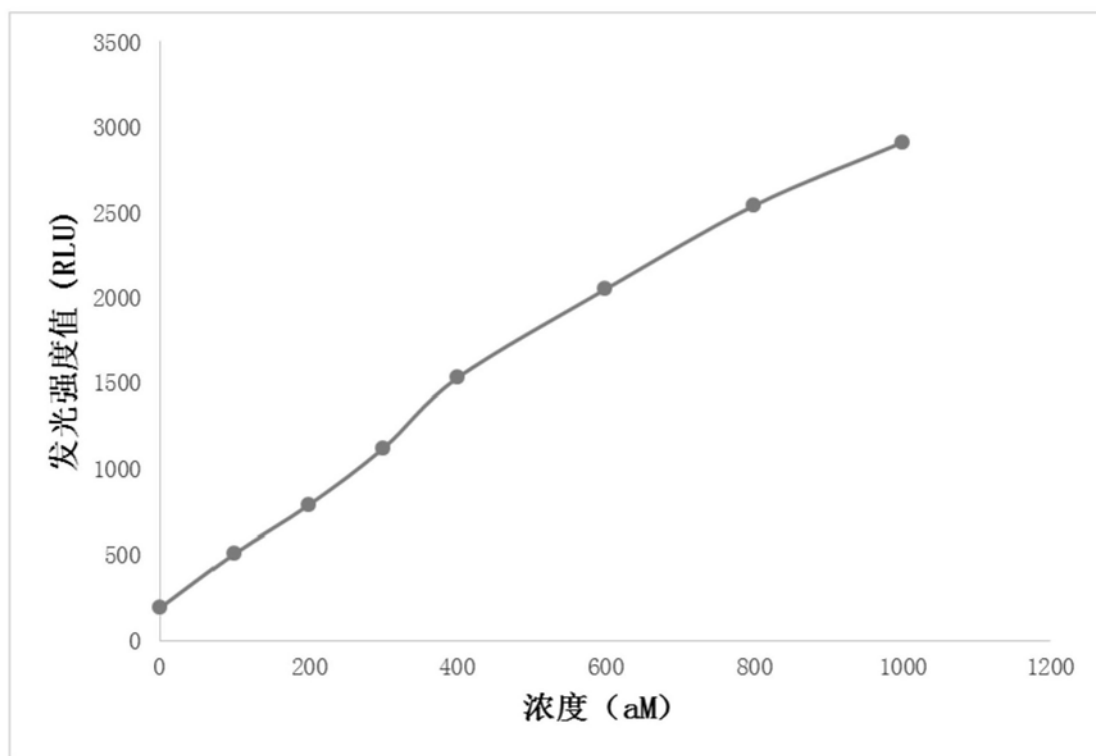


图4

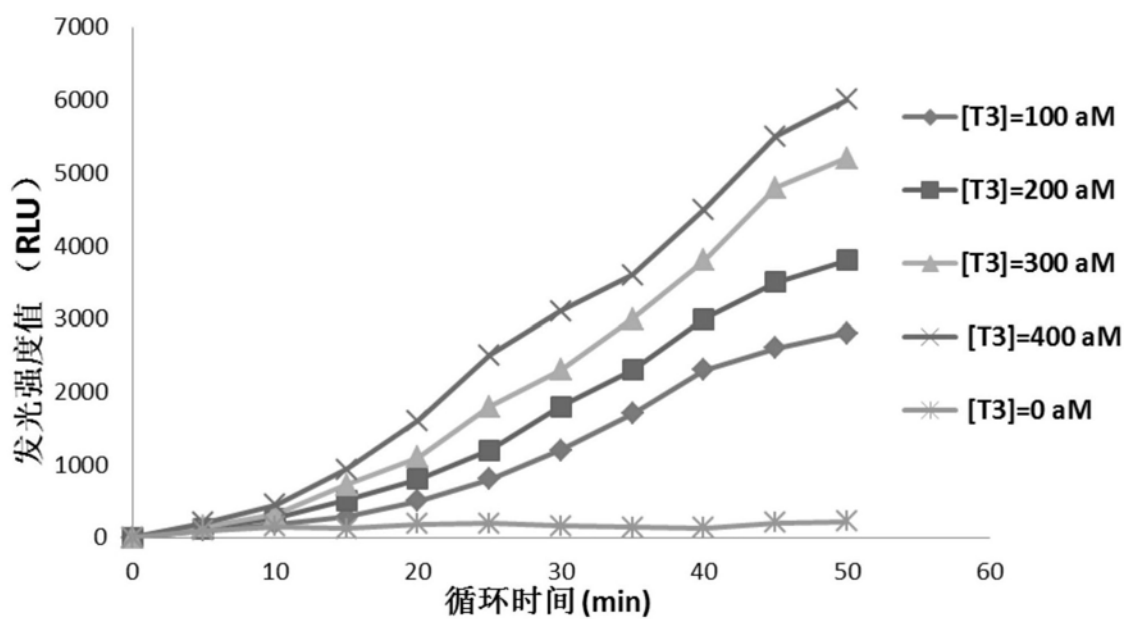


图5

专利名称(译)	目标物含量检测方法以及检测试剂在该检测方法中的应用		
公开(公告)号	CN108872205A	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810619580.0	申请日	2018-06-19
[标]发明人	陈小茹 吴向东		
发明人	陈小茹 吴向东		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
代理人(译)	胡海国		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种目标物含量检测方法，包括将样本S1与酶循环试剂接触，经预设时间T1得到中间样本S2；然后向中间样本S2中加入发光试剂得到发光的中间样本S3，并测定中间样本S3的发光信号强度；再基于预先建立的所述发光信号强度与第一底物浓度的关联模型，确定样本S1中的第一底物浓度。此外，本发明还提供一种检测试剂在目标物含量检测方法中的应用。本发明通过合理的设计，将酶循环法和化学发光法巧妙地联合，既放大了检测信号浓度，又能借助化学发光法灵敏响应H₂O₂信号，使检测灵敏度提高到埃摩尔水平，极大地提高了临床体外诊断检测的精准率，解决了目前市场上缺乏有效地实现埃摩尔水平样本生化和化学发光检测方法的现状。

