

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/32 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410041964.7

[45] 授权公告日 2007年2月28日

[11] 授权公告号 CN 1302119C

[22] 申请日 2004.9.14

[21] 申请号 200410041964.7

[73] 专利权人 王尔中

地址 215021 江苏省苏州市工业园区机场
路328号国际科技园122B

[72] 发明人 王尔中

[56] 参考文献

CN1033075A 1989.5.24

CN1454262A 2003.11.5

审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公
司
代理人 何朝旭

权利要求书2页 说明书10页

[54] 发明名称

5' - 核苷酸酶活性测定方法及5' - 核苷酸
酶诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种测定5' - 核苷酸酶活性的方法,同时本发明还涉及5' - 核苷酸酶诊断试剂盒,属于医学检验测定技术领域。该试剂盒包括缓冲液、腺苷单磷酸、2 - 酮戊二酸酯、还原性辅酶、腺苷脱氨酶、谷氨酸脱氢酶、稳定剂等。通过将样品与试剂按一定的体积比混合,使之发生酶偶联反应,再将最终反应物置于生化分析仪下,检测主波长吸光度变化的情况(速度),从而测算出5' - 核苷酸酶的活性大小。采用本发明完全可以通过生化分析仪器得出所需的测定结果,并且灵敏度高、精确度好,不受内外源物质的污染,便于推广应用。

1. 一种 5'-核苷酸酶活性测定方法，步骤如下：

1)、将样品与主要由腺苷单磷酸、2-酮戊二酸酯、还原性辅酶、腺苷脱氨酶、谷氨酸脱氢酶组成的试剂混合，使之发生如下原理的反应：

腺苷单磷酸+水 5'-核苷酸酶 腺苷+ 单磷酸盐

腺苷+水 腺苷脱氨酶 肌苷+氨离子

氨离子 +2-酮戊二酸酯 + 还原型辅酶 谷氨酸脱氢酶 谷氨酸
+ 辅酶+水

2)、检测最终反应物在主波长 340 nm 吸光度下降的速度，测算出 5'-核苷酸酶的活性大小。

2. 根据权利要求 1 所述 5'-核苷酸酶活性测定方法，其特征在于：所述步骤 2) 为，将最终反应物置于紫外/可见光分析仪或者半、全自动生化分析仪下，检测主波长 340 nm，吸光度下降的速度，测算出 5'-核苷酸酶的活性大小。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述 5'-核苷酸酶活性测定方法，其特征在于：温度控制在 20 °C 到 50 °C 范围，反应时间控制在 2-30 分钟。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述 5'-核苷酸酶活性测定方法，其特征在于：被测 5'-核苷酸酶样品与试剂的比例控制在 1/10 到 1/250。

5. 一种 5'-核苷酸酶诊断试剂盒，由以下成分组成：

缓冲液	40——200 mmol/l
腺苷单磷酸	1 —— 50mmol/l
2-酮戊二酸酯	0.5 —— 50mmol/l

还原性辅酶	0.15—— 0.3mmol/l
腺苷脱氨酶	5000 —— 500000U/l
谷氨酸脱氢酶	50000 —— 500000U/l
稳定剂	10——80 % (总体积)。

6. 根据权利要求5所述5'-核苷酸酶诊断试剂盒, 其特征在于: 所述试剂配成单剂、双剂或三剂。

7. 根据权利要求5或6所述5'-核苷酸酶诊断试剂盒, 其特征在于: 所述稳定剂为乙二醇、丙二醇、甘油、聚糖、聚醇、硫酸铵、NaCl或腺苷二磷酸中的至少一种。

8. 根据权利要求5或6所述5'-核苷酸酶诊断试剂盒, 其特征在于: 所述缓冲剂为三(羧甲基)氨基甲烷—盐酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、三乙醇胺缓冲液、2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液或双甘氨酸缓冲液中的一种。

9. 根据权利要求5或6所述5'-核苷酸酶诊断试剂盒, 其特征在于: 所述还原型辅酶为NADPH、NADH、thio-NADH还原型烟酰胺辅酶中的一种。

5'-核苷酸酶活性测定方法及5'-核苷酸酶诊断试剂盒

技术领域

本发明涉及一种测定5'-核苷酸酶活性的方法,同时本发明还涉及用于实现该方法的5'-核苷酸酶诊断试剂盒,属于医学检验测定技术领域。

背景技术

医学研究表明,5'-核苷酸酶(5NT)增高主要见于阻塞性黄疸,也可见于肝癌和肝炎。在胆汁淤积并发胆管炎、原发性和继发性胆汁性肝硬化和慢性肝炎时,5NT升高率高于碱性磷酸酶;肝肿瘤和肝肉芽肿时5NT升高的敏感性高于碱性磷酸酶。因为5'-核苷酸酶活性无生理性升高,对于诊断婴幼儿肝病和妊娠性肝功胆汁淤积较碱性磷酸酶不但敏感,而且有特异性。因此测定5'-核苷酸酶的活性对于疾病的诊断具有重要意义。

5'-核苷酸酶的活性测定方法很多,主要有同位素底物法、化学强酸测磷法(1925年)。据申请人了解,目前国际上普遍采用同位素底物测试法,方法为:5'-核苷酸酶作用于 H^3 -dUMP,终止反应后,通过离子交换层析柱分析结果,求得5'-核苷酸酶活性。或者利用5'-核苷酸酶作用于单磷酸腺苷后产生无机磷,再用化学强酸法分析无机磷含量得以计算出5'-核苷酸酶的活性。

同位素底物法方法复杂还有同位素污染,而且需要同位素测定仪,因此难以切实推广应用。无机磷测定法是1925年发明的方法,准确度不好,强酸污染环境等等,也不适合推广应用。

发明内容

本发明要解决的技术问题是：提出一种可以克服以上现有技术缺点的 5'-核苷酸酶活性的测定方法，同时给出用以实现该方法的 5'-核苷酸酶诊断试剂盒。采用该试剂盒中的试剂不仅可以在紫外/可见光分析仪或者半、全自动生化分析仪上进行 5'-核苷酸酶活性测定，而且测定速度快、准确度高，因而可以得到切实的推广应用。

本发明测定 5'-核苷酸酶活性的步骤如下：

1)、将样品与主要由腺苷单磷酸、2-酮戊二酸酯、还原性辅酶、腺苷脱氨酶、谷氨酸脱氢酶组成的试剂混合，使之发生如下原理的反应：

腺苷单磷酸+水 5'-核苷酸酶 腺苷+ 单磷酸盐

腺苷+水 腺苷脱氨酶 肌苷+氨离子

氨离子 +2-酮戊二酸酯 + 还原型辅酶 谷氨酸脱氢酶 谷氨酸
+ 辅酶+水

2)、检测最终反应物在主波长 340 nm 吸光度下降的速度，测算出 5'-核苷酸酶的活性大小。

通常步骤 2) 将最终反应物置于紫外/可见光分析仪或者半、全自动生化分析仪器下，检测主波长 340 nm 吸光度下降的速度，测算出 5'-核苷酸酶的活性大小。

以上样品与试剂的混合比例按体积为 1/10 到 1/250，以上过程的测定温度控制在常规的 20 °C 到 50 °C 范围，反应时间控制在常规的 2-30 分钟。

这种方法应用 5'-核苷酸酶偶联腺苷脱氨酶、谷氨酸脱氢酶反应连续监测法。5'-核苷酸酶水解腺苷单磷酸产生腺苷，然后腺苷脱氨酶再水解腺苷产生氨，再通过偶联谷氨酸脱氢酶的作用，将还原型辅酶 (NADH、NADPH 或其它类似物——在 340 nm 处有吸收峰) 氧化成

为辅酶 (NAD⁺、NADP⁺或其它类似物——在 340 nm 处没有吸收峰), 从而得以测定还原型辅酶在 340 nm 处吸光度下降的速度, 通过测量 340nm 处吸光度下降的速度, 可以测算 5'-核苷酸酶的活性大小。

用以实现本发明方法的 5'-核苷酸酶诊断试剂盒可以是单剂, 包括:

缓冲液	40——200 mmol/l
腺苷单磷酸	1 —— 50mmol/l
2-酮戊二酸酯	0.5 —— 50mmol/l
还原性辅酶	0.15—— 0.3mmo/l
腺苷脱氨酶	5000 —— 500000U/l
谷氨酸脱氢酶	50000 —— 500000U/l
稳定剂	10——80% (总体积)

也可以将以上单剂配成如下双剂, 更有利于消除内、外源腺苷及氨的污染:

试剂 I

缓冲液	40——200 mmol/l
2-酮戊二酸酯	0.5 —— 50 mmol/l
还原型辅酶	0.15 —— 0.3 mmol/l
谷氨酸脱氢酶	50000 —— 500000 U/l
腺苷脱氨酶	5000 —— 500000 U/l
稳定剂	10——80% (总体积)

试剂 II

缓冲液	40——200 mmol/l
腺苷单磷酸	1 —— 50mmol/l
稳定剂	10——50 mmol/l

双剂的配方不仅限于上述配方，其中的试剂 I 的成分，2-酮戊二酸酯、谷氨酸脱氢酶、腺苷脱氨酶等可以放在试剂 II，试剂 II 其中的成分，腺苷单磷酸也可以放在试剂 I，如此可以形成多种配方，不在此一一详述。

还可以将试剂配成如下三试剂，不但更有利于消除内、外源腺苷及氨的污染，还更有利于试剂的稳定：

试剂 I

缓冲液	40—200 mmol/l
2-酮戊二酸酯	0.5 — 50 mmol/l
还原型辅酶	0.15 — 0.3 mmol/l
稳定剂	10—50 mmol/l

试剂 II

缓冲液	40—200 mmol/l
谷氨酸脱氢酶	50000 — 500000 U/l
腺苷脱氨酶	5000 — 500000 U/l
稳定剂	10—80 % (总体积)

试剂 III

缓冲液	40—200 mmol/l
腺苷单磷酸	1 — 50 mmol/l
稳定剂	10—50 mmol/l

三剂的配方不仅限于上述配方，其中的试剂 I 的成分，2-酮戊二酸酯等可以放在试剂 II 或试剂 III 中，试剂 II 其中的成分，谷氨酸脱氢酶、腺苷脱氨酶等也可以放在试剂 I 或试剂 III 中，如此可以形成多种配方，不一一详述。

缓冲剂可以是三(羧甲基)氨基甲烷—盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液、

磷酸盐 (Phosphate) 缓冲液、三乙醇胺 (Triethanolamine) 缓冲液、2-氨基-2-甲基-1-丙醇 (2-Amino-2-methyl-1-propanol) 缓冲液或双甘氨酸 (Glycylglycine) 缓冲液等。

以上还原型辅酶可以是 NADPH、NADH 或 thio-NADH 等还原型烟酰胺辅酶或其衍生物。

此外,为了减少各试剂成分之间的交叉影响、保持试剂的稳定性,以便长期储存,以上单剂、双剂的试剂 I、试剂 II 或三剂的试剂 I、试剂 II、试剂 III 中通常加入稳定剂 10—80 % 或者 10—50 mmol/l, 稳定剂可以是乙二醇、丙二醇、甘油、聚糖、聚醇、硫酸胺、盐或腺苷二磷酸等中的一种或一种以上。

实验表明,从测定结果的准确性和配制成本的经济性两方面综合考虑,无论是单剂、双剂还是三剂,如下配方成分关系的本发明 5'-核苷酸酶诊断试剂盒较为理想:

缓冲液	80—120 mmol/l
腺苷单磷酸	5—20 mmol/l
2-酮戊二酸酯	5—20 mmol/l
还原性辅酶	0.15—0.3 mmol/l
腺苷脱氨酶	10000 — 20000 U/l
谷氨酸脱氢酶	100000 — 200000 U/l
稳定剂	20—50 %

由于本发明完全利用酶学方法,酶解反应具有特异性高的特点,不易受到内、外源其他物质的干扰。酶法方法简便、易于操作。酶解反应的特异性促使测试结果精确。酶解反应都是在缓冲液条件下进行,没有污染环境问题。酶法方法不需要特殊、额外的仪器,测试成本低廉。因此可以保证具有较高的测试准确性,更便于推广应用。

此外,本发明的显著特色之一是可以消除内、外源腺苷及氨的污染,消除内、外源腺苷及氨的作用发生在整个反应时间段的前半部分,在后半段时间受污染的内、外源腺苷及氨已经被消耗殆尽,而在后半段时间测试 5'-核苷酸酶活性所需要的腺苷及氨都是产生于 5'-核苷酸酶的活性。

具体实施方式

下面结合实施例子对本发明作进一步的说明。

实施例一(单剂)

本实施例的 5'-核苷酸酶诊断试剂盒包括:

缓冲液	80 mmol/l
腺苷单磷酸	5 mmol/l
2-酮戊二酸酯	5 mmol/l
还原性辅酶	0.15 mmol/l
腺苷脱氨酶	10000 U/l
谷氨酸脱氢酶	100000 U/l
稳定剂	30 % (总体积)

在全自动生化分析仪上设定: 温度 37 °C, 反应时间 10 分钟, 测试主波长 340 nm, 测试副波长 405 nm 以上, 被测 5'-核苷酸酶样品与试剂的体积比例为 1/25, 反应方向为负反应, 延迟时间 1 分钟, 检测时间 2 分钟, 理论 K 值-4180。

加入样品和试剂后, 使之混合, 发生以下反应:

腺苷单磷酸+水 5'-核苷酸酶 腺苷+ 单磷酸盐

腺苷+水 腺苷脱氨酶 肌苷+氨离子

氨离子 +2-酮戊二酸酯 + 还原型辅酶 谷氨酸脱氢酶 谷氨酸
+ 辅酶+水

将最终反应物置于生化分析仪器下，检测主波长 340 nm 吸光度下降的速度，从而测算出 5'-核苷酸酶的活性大小。

这种方法应用 5'-核苷酸酶偶联腺苷脱氨酶、谷氨酸脱氢酶反应连续监测法。5'-核苷酸酶水解腺苷单磷酸产生腺苷，然后腺苷脱氨酶再水解腺苷产生氨，再通过偶联谷氨酸脱氢酶的作用，将还原型辅酶（NADH、NADPH 或其它类似物——在 340 nm 处有吸收峰）氧化成为辅酶（NAD⁺、NADP⁺或其它类似物——在 340 nm 处没有吸收峰），从而得以测定还原型辅酶在 340 nm 处吸光度下降的速度，通过测量 340nm 处吸光度下降的速度，可以测算 5'-核苷酸酶的活性大小。

实施例二（双剂）

本实施例的 5'-核苷酸酶诊断试剂有：

试剂 I

缓冲液	100 mmol/l
2-酮戊二酸酯	12 mmol/l
还原性辅酶	0.2 mmol/l
腺苷脱氨酶	15000 U/l
谷氨酸脱氢酶	150000 U/l
稳定剂	40 % (总体积)

试剂 II

缓冲液	100 mmol/l
腺苷单磷酸	12 mmol/l
稳定剂	30 mmol/l

测定 5'-核苷酸酶活性时，温度控制在 30 °C，反应时间 10 分钟，测试主波长 340 nm，测试副波长 405 nm 以上，被测 5'-核苷酸酶样品与试剂的体积比例为 1/25，反应方向为负反应，延迟时间 1

分钟，检测时间：2 分钟，理论 K 值-4180。

具体测定步骤为：

腺苷单磷酸+水 5'-核苷酸酶 腺苷+ 单磷酸盐

腺苷+水 腺苷脱氨酶 肌苷+氨离子

氨离子 +2-酮戊二酸酯 + 还原型辅酶 谷氨酸脱氢酶 谷氨酸
+ 辅酶+水

将最终反应物置于生化分析仪器下，检测主波长 340 nm 吸光度下降的速度，从而测算出 5'-核苷酸酶的活性大小。

各反应步骤的反应时间控制在 10 分钟。

实施例三（三剂）

本实施例的 5'-核苷酸酶诊断试剂为三剂，有：

试剂 I

缓冲液	120 mmol/l
2-酮戊二酸酯	20 mmol/l
还原性辅酶	0.3 mmol/l
稳定剂	50 mmol/l

试剂 II

缓冲液	120 mmol/l
腺苷脱氨酶	20000 U/l
谷氨酸脱氢酶	200000 U/l
稳定剂	50 % (总体积)

试剂 III

缓冲液	120 mmol/l
腺苷单磷酸	20 mmol/l
稳定剂	50 mmol/l

在全自动生化分析仪上设定：温度 25 °C，反应时间 10 分钟，测试主波长 340 nm，测试副波长 405 nm 以上，被测 5'-核苷酸酶样品与试剂的体积比例为 1/25，反应方向为负反应，延迟时间 1 分钟，检测时间 2 分钟，理论 K 值-4180。

具体测定步骤为：

腺苷单磷酸+水 5'-核苷酸酶 腺苷+ 单磷酸盐

腺苷+水 腺苷脱氨酶 肌苷+氨离子

氨离子 +2-酮戊二酸酯 + 还原型辅酶 谷氨酸脱氢酶 谷氨酸
+ 辅酶+水

将最终反应物置于生化分析仪器下，检测主波长 340 nm 吸光度下降的速度，从而测算出 5'-核苷酸酶的活性大小。

各反应步骤的反应时间控制在 10 分钟。

实施例四

本实施例的 5'-核苷酸酶诊断试剂有：

试剂 I

缓冲液	120 mmol/l
腺苷单磷酸	20 mmol/l
2-酮戊二酸酯	20 mmol/l
还原性辅酶	0.3 mmol/l
谷氨酸脱氢酶	200000 U/l
稳定剂	50 % (总体积)

试剂 II

缓冲液	120 mmol/l
腺苷单磷酸	5 mmol/l
腺苷脱氨酶	10000 U/l

稳定剂 50 % (总体积)

在生化分析仪上设定：温度 25 °C，反应时间 10 分钟，测试主波长 340 nm，测试副波长 405 nm 以上，被测 5'-核苷酸酶样品与试剂的体积比例为 1/25，反应方向为负反应，延迟时间 1 分钟，检测时间 2 分钟，理论 K 值-4180。

加入样品和试剂后，使之混合，发生以下反应：

腺苷单磷酸+水 5'-核苷酸酶 腺苷+ 单磷酸盐

腺苷+水 腺苷脱氨酶 肌苷+氨离子

氨离子 +2-酮戊二酸酯 + 还原型辅酶 谷氨酸脱氢酶 谷氨酸
+ 辅酶+水

将最终反应物置于生化分析仪器下，检测主波长 340 nm 吸光度下降的速度，从而测算出 5'-核苷酸酶的活性。