



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103492881 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201180067993. 9

(22) 申请日 2011. 12. 19

(30) 优先权数据

1021509. 3 2010. 12. 20 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 08. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2011/001731 2011. 12. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/085497 EN 2012. 06. 28

(71) 申请人 反应实验室有限公司

地址 英国格拉斯哥

(72) 发明人 P. D. 埃科萨尔 E. 麦库洛奇

S. 多彻尔蒂

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 罗文锋 权陆军

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

测定方法

(57) 摘要

本发明提供了用于确定样品中触珠蛋白水平的测定方法,所述测定方法包括以下步骤:(i) 将血红蛋白与待测定样品混合以形成带有存在于所述样品中的触珠蛋白的触珠蛋白-血红蛋白复合物;(ii) 在缓冲液存在的情况和以下条件下,将步骤(i)的产物与用于产生过氧化氢的试剂和当存在过氧化物酶活性时经历光谱可检测的变化的一种或多种色原接触;在所述条件中过氧化氢从所述试剂中产生并形成用于存在的触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性的底物,并且其中所述缓冲液的pH在足够低到任何未复合的血红蛋白的过氧化物酶活性基本被遏制但足够高到产生过氧化氢的范围内;(iii) 通过测量所述反应混合物的光学性质的变化来确定所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性;和(iv) 将所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性水平与所述样品中触珠蛋白的量关联。本发明还提供了用于此类方法的试剂盒。

1. 一种用于确定样品中触珠蛋白水平的测定方法,所述测定方法包括以下步骤:
 - (i) 将血红蛋白与待测定样品混合以形成带有存在于所述样品中的触珠蛋白的触珠蛋白-血红蛋白复合物;
 - (ii) 在缓冲液存在的情况和以下条件下,将步骤(i)的产物与用于产生过氧化氢的试剂和当存在过氧化物酶活性时经历光学可检测的变化的一种或多种色原接触;在所述条件中过氧化氢从所述试剂中产生并形成用于存在的触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性的底物,并且其中所述缓冲液的pH在足够低到任何未复合的血红蛋白的过氧化物酶活性基本被遏制但足够高到产生过氧化氢的范围内;
 - (iii) 通过测量所述反应混合物的光学性质的变化来确定所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性;和
 - (iv) 将所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性水平与所述样品中触珠蛋白的量关联。
2. 权利要求1的测定方法,其中步骤(i)和步骤(ii)同时进行。
3. 权利要求1或权利要求2的测定方法,其中所述测定在pH3.9-pH4.5的pH下进行。
4. 权利要求3的测定方法,其中所述测定在pH4-pH4.5的pH下进行。
5. 权利要求4的测定方法,其中所述测定在4.1的pH下进行。
6. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中用于产生过氧化氢的试剂包含催化产生过氧化氢作为反应产物的反应的酶连同用于所述酶的底物。
7. 权利要求6的测定方法,其中所述用于产生过氧化氢的试剂包含葡萄糖氧化酶和底物葡萄糖。
8. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中当存在过氧化物酶活性时所述色原经历可被光谱检测的颜色变化。
9. 权利要求8的测定方法,其中所述色原包含:苯酚、4-碘苯酚、3-氨基比林、8-苯胺基萘磺酸(ANS)、4-氨基安替比林(AAP)、2-氨基-4-羟基苯磺酸(AHBS)、四甲基联苯胺(TMB)、邻苯二胺二盐酸盐、邻联茴香胺、2-羟基-3,5-二氯苯磺酸钠和2,2'-连氨基-2-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)或其混合物。
10. 权利要求9的测定方法,其中所述色原包含苯酚、8-苯胺基萘磺酸(ANS)和4-氨基安替比林的组合。
11. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中所述测定在用于减少由于样品中的白蛋白或其他蛋白所致的过氧化物酶作用的一种或多种另外试剂存在的情况下进行。
12. 权利要求11的测定方法,其中所述一种或多种另外的试剂选自蛋白结合抑制剂、有效针对二硫键的还原剂和离液剂或其混合物。
13. 权利要求12的测定方法,其中所述蛋白结合抑制剂包含8-苯胺基萘磺酸(ANS)、原卟啉、胆红素、牛磺去氧胆酸(胆汁盐)、双香豆素或2-巯基苯并噻唑。
14. 权利要求12或权利要求13的测定方法,其中所述还原剂包含二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、半胱氨酸、巯基乙醇、谷胱甘肽、4'-二硫代吡啶或5,5'-二硫代(2-硝基苯甲酸)。
15. 权利要求12-14中任一项的测定方法,其中所述离液剂包含盐酸胍、硫氰酸钾或氯化钠。
16. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中所述测定混合物还包含洗涤剂。

17. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中所述测定混合物还包含抗菌剂。
18. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中所述测定通过形成待测定样品与第一反应混合物和第二反应混合物的混合物来进行。
19. 权利要求 18 的测定方法,其中所述第一试剂混合物包含血红蛋白和催化产生过氧化氢作为反应产物的反应的酶并且第二试剂混合物包含一种或多种色原和用于所述第一混合物的酶的底物。
20. 权利要求 19 的测定方法,其中所述一种或多种色原包含在所述第一反应混合物中。
21. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中所述组分测定试剂的一些或全部以干燥形式组合并接着加入含水样品中以进行所述测定。
22. 权利要求 21 的测定方法,其中所述测定试剂组合以溶液制备并冷冻干燥在固体表面上。
23. 权利要求 22 的测定方法,其中所述固体表面为纸或测定条。
24. 前述权利要求中任一项的测定方法,其中通过参考利用触珠蛋白的已知浓度生成的标准曲线将所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性的水平与所述样品中触珠蛋白的量关联。
25. 一种用于前述权利要求中任一项的触珠蛋白测定的试剂盒,所述试剂盒包含血红蛋白、用于产生过氧化氢的试剂、当存在过氧化物酶活性时经历光学可检测的变化的一种或多种色原和缓冲液。
26. 一种测定方法,所述测定方法基本如本文所述。
27. 一种试剂盒,所述试剂盒基本如本文所述。

测定方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于确定样品中触珠蛋白水平的测定和试剂盒。特别地,本发明涉及易于适应于以干燥形式运行的用于确定触珠蛋白水平的测定,在所述形式中试剂在运行所述测定前在表面上干燥。

[0002] 发明背景

触珠蛋白是一群被称作急性期蛋白的蛋白之一,在感染、炎症或外伤后其浓度显著上升。因此测量血浆中触珠蛋白的浓度对样品所获自的人或动物的健康状况提供有价值的诊断信息,在本领域中在开发用于血浆、血清和其它生物流体中的触珠蛋白的测定方面已有相当兴趣。

[0003] 目前用于确定样品中触珠蛋白浓度的测定通常基于免疫测定或基于依赖于触珠蛋白结合血红蛋白的能力的血红蛋白结合。

[0004] 运用基于抗体的方法和特异性针对触珠蛋白的抗血清的免疫测定已经开发并且为本领域已知。通常,此类测定基于免疫比浊测定,触珠蛋白的浓度经由测量溶液中抗体-触珠蛋白沉淀物的形成来确定。酶联免疫吸附测定(ELISA)是此类测定的另一种常见实施方案。做此类免疫测定不仅需要抗血清的持续供给,而且试验必须对研究中的各个独立物种进行验证,使得基于免疫测定的方法商业吸引力较少。

[0005] 基于触珠蛋白结合血红蛋白的能力的测定现在常规用于兽医诊断实验室。其在经济上更可行,因为它们比基于抗体的方法需要更少昂贵的试剂并且还可对所有物种进行。

[0006] 在 EP 1031035B1 中描述了一种血红蛋白结合测定系统,其利用了触珠蛋白结合血红蛋白的内源活性。在低 pH 下,所得触珠蛋白-血红蛋白复合物保留了过氧化物酶活性,而未结合的血红蛋白的过氧化物酶活性是失活的。通过检测过氧化物酶的活性,可确定存在的复合的血红蛋白的量并从而可确定样品的触珠蛋白含量。在 EP 1031035B1 中所述的测定系统中,应用试剂例如蛋白结合抑制剂和有效针对二硫键的还原剂和/或离液剂以抑制在触珠蛋白的低血液浓度时干扰测定的血清血红蛋白的过氧化物酶活性。

[0007] 与迄今描述的血红蛋白结合测定(例如以上论述的 EP 1031035B1 中所述的测定)相关的主要缺点,是需要过氧化氢作为用于所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性的底物。过氧化氢是高活性的并且需要稳定化以防止其氧化所述测定中的其它组分。这不仅限制了所述测定的实用性,而且还使所述测定不适于适应干燥化学形式,例如用于目测评价或基于仪器的评价的“试条(dip-stick)”布置。

[0008] US 4695552 描述了在游离血红蛋白存在的情况下确定血红蛋白-触珠蛋白复合物的方法,所述方法涉及确定过氧化物酶的活性。但是,所述过氧化物酶活性的底物是过氧化氢。过氧化氢还作为试剂与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺一起用于 JP 2208568 中所述的触珠蛋白确定方法中。

[0009] 因此仍有对克服现有技术测定方法相关问题的用于确定样品中触珠蛋白水平的改良测定的持续需要。

[0010] 发明简述

本发明提供了用于确定样品中触珠蛋白水平的测定方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 将血红蛋白与待测定样品混合以形成带有存在于所述样品中的触珠蛋白的触珠蛋白-血红蛋白复合物;

(ii) 在缓冲液存在的情况和以下条件下,将步骤(i)的产物与用于产生过氧化氢的试剂和当存在过氧化物酶活性时经历光学可检测的变化的一种或多种色原接触;在所述条件中过氧化氢从所述试剂中产生并形成用于存在的触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性的底物,并且其中所述缓冲液的 pH 在足够低到任何未复合的血红蛋白的过氧化物酶活性基本被遏制但足够高到产生过氧化氢的范围内;

(iii) 通过测量所述反应混合物的光学性质的变化来确定所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性;和

(iv) 将所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性水平与所述样品中触珠蛋白的量关联。

[0011] 合适地,在以上方法中,步骤(i)和(ii)例如通过形成包含待测定样品、血红蛋白、用于产生过氧化氢的试剂、当存在过氧化物酶活性时经历光谱可检测变化的一种或多种色原和合适的缓冲液中的全部的反应混合物来同时进行。

[0012] 本发明还提供了用于本发明的触珠蛋白测定的试剂盒,其包含血红蛋白、用于产生过氧化氢的试剂、当存在过氧化物酶活性时经历光学可检测的变化的一种或多种色原和缓冲液。

[0013] 通过本发明,提供了用于确定样品中触珠蛋白水平的测定方法,其通过确定与所述触珠蛋白复合的血红蛋白的过氧化物酶活性来利用触珠蛋白结合血红蛋白的内源活性,但其避免了包含过氧化氢作为试剂以提供用于该过氧化物酶活性的底物的需要。其中过氧化氢底物在原位产生的触珠蛋白的无过氧化物测定的开发,是特别有利的,因为其避免了当不稳定并且高活性的过氧化氢直接用作试剂时加诸于测定上的实际限制,从而促进所述测定在广范围的情况和测定形式中的用途。

[0014] 发明详述

本发明的测定方法可合适地对来自任何动物的血液样品,例如血浆或血清进行。或者,用于所述测定的样品可包含其它的生物流体例如腹水、滑液、脑脊液等。在一个实施方案中,所述样品可获自包括人在内的哺乳动物。

[0015] 在一个实施方案中,所述样品中触珠蛋白的浓度为 0.02 mg/ml-1.4 mg/ml。

[0016] 用于本发明的测定方法的血红蛋白可获自从中获得用于测定的样品的相同的动物,或者其可获自不同的物种。

[0017] 在一个实施方案中,所述血红蛋白为高铁血红蛋白。

[0018] 在本发明的测定方法中,所述样品中的触珠蛋白和添加的血红蛋白共同反应以形成触珠蛋白-血红蛋白复合物。

[0019] 在一个实施方案中,所述测定反应混合物孵育多至 20 分钟,例如 5-20 分钟。

[0020] 本发明方法的触珠蛋白-血红蛋白复合物的形成通过经由测量所述反应混合物光学性质的变化而确定所述复合物的过氧化物酶活性来检测。所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性的水平可接着与所述样品中触珠蛋白的量关联。

[0021] 在本发明的测定方法中,所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性通过

在所述测定中原位产生过氧化氢以形成用于所述复合物的过氧化物酶活性的底物并利用当存在过氧化物酶活性时经历光谱可检测的变化的色原检测所述过氧化物酶活性来确定。

[0022] 本发明用于产生过氧化氢的试剂合适地包含催化产生过氧化氢作为反应产物的反应的酶连同用于所述酶的底物。

[0023] 在本发明的一个实施方案中,所述用于产生过氧化氢的试剂包含葡萄糖氧化酶和底物葡萄糖。

[0024] 应理解的是可使用其它合适的酶/底物的组合以在所述测定中原位产生过氧化氢。可使用本领域常规的产生过氧化氢的任何酶/底物的组合例如胆固醇/胆固醇氧化酶或尿素/尿素氧化酶。

[0025] 当存在过氧化物酶活性时经历光谱可检测的变化的色原为本领域所熟知并描述于例如以上论述的 EP 1031035B1 中。

[0026] 用于测定血红蛋白水平的本领域已知的任何显色底物可方便地用于本发明的测定中。在一个实施方案中,本发明测定的血红蛋白-触珠蛋白复合物的过氧化物酶活性用当存在过氧化物酶活性时经历可分光光度检测的颜色变化的色原(例如:苯酚、4-碘苯酚、3-氨基比林(3-aminophenozone)、8-苯胺基萘磺酸(ANS)、4-氨基安替比林(AAP)、2-氨基-4-羟基苯磺酸(AHBS)、四甲基联苯胺(TMB)、邻苯二胺二盐酸盐、邻联茴香胺、2-羟基-3,5-二氯苯磺酸钠、2,2'-连氨基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)或其混合物)来确定。

[0027] 在一个实施方案中,用于本发明的测定中的显色底物包含苯酚、8-苯胺基萘磺酸(ANS)和4-氨基安替比林的组合。

[0028] 可检测的颜色变化可用以本领域中常规的各种浓度范围存在的色原来检测。

[0029] 所述触珠蛋白-血红蛋白复合物的过氧化物酶活性和所述原位产生过氧化氢的试剂的活性两者是 pH 依赖的,因而本发明解决的难题是寻找一种 pH 范围,所述 pH 范围中两种活性是起作用的。

[0030] 本领域已知的是未复合的血红蛋白的过氧化物酶活性在低 pH 下可为失活的。如 Jpn. J Vet. Sci, 44, 第 15-21 页(1982)中报道的,该活性可在 pH 4.1 下失活。然而已表明在此类 pH 下因游离的血红蛋白所致的过氧化物酶活性可保留并且以上论述的 EP 1031035B1 中所述的测定优选在低于 4.1 的 pH 下,特别地在 pH 3.8 下进行。

[0031] 然而本发明人已发现通过在缓冲液存在的情况下在 3.9-4.5 的 pH 范围下进行本发明测定方法,测定混合物中残留的任何未复合的血红蛋白的过氧化物酶活性可基本被遏制而不抑制原位过氧化氢的产生。

[0032] 在一个实施方案中,本发明的测定方法在缓冲液存在的情况下在 4-4.5 的 pH 范围下进行。

[0033] 在特定的实施方案中,本发明的测定方法在 4.1 的 pH 下进行。

[0034] 可应用本领域常规的任何缓冲液以保持所述测定的所需 pH。方便地,可应用混合的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液,用柠檬酸盐缓冲液(pH 3.8)将磷酸盐缓冲液(pH 7.4)滴定至所需 pH。

[0035] 从 EP 1031035B1 已知的是,血液样品中存在的白蛋白和其他蛋白对依赖于触珠蛋白-血红蛋白复合物的固有过氧化物酶活性的触珠蛋白测定有非所需的“过氧化物酶作

用”。

[0036] 因此,在一个实施方案中,本发明的测定方法在用于减少由于样品中的任何白蛋白或其他蛋白所致的过氧化物酶作用的一种或多种另外试剂存在的情况下进行。应理解的是此类另外的一种或多种试剂可以不足以显著抑制触珠蛋白-血红蛋白复合物的形成的量添加。

[0037] 用于减少由于样品中的任何白蛋白或其他蛋白所致的过氧化物酶作用的合适的另外试剂为如 EP 1031035B1 中所述的,包括例如蛋白结合抑制剂、有效针对二硫键的还原剂和离液剂。

[0038] 在一个实施方案中,所述另外的一种或多种试剂可以 0.1-0.5mM 浓度存在。

[0039] 在一个实施方案中,本发明的测定方法在蛋白结合抑制剂例如 8-苯胺基萘磺酸(ANS)、原卟啉、胆红素、牛磺去氧胆酸(胆汁盐)、双香豆素或 2-巯基苯并噻唑存在的情况下进行。

[0040] 在另一个实施方案中,有效针对二硫键的另外的还原剂选自二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、半胱氨酸、巯基乙醇、谷胱甘肽、4,4'-二硫代吡啶或 5,5'-二硫代(2-硝基苯甲酸)。

[0041] 在另一个实施方案中,本发明的测定方法在合适的离液剂(例如盐酸胍、硫氰酸钾或氯化钠)存在的情况下进行。

[0042] 本发明的测定合适地还包含洗涤剂以帮助保持溶液中的其它组分。

[0043] 在一个实施方案中,洗涤剂以低浓度,合适地以多至 0.3%(v/v) 的量加入测定混合物中。

[0044] 可应用的合适的洗涤剂包括本领域常规的非离子型和离子型表面活性剂。

[0045] 在一个实施方案中,用于添加到所述测定混合物中的洗涤剂包含非离子型表面活性剂,例如聚氧乙烯(polyoxyethylene)山梨糖醇酯(例如 Tween™ 20、40、60、80)、聚氧乙烯醇(例如 Brij™ 35、36)或其混合物。

[0046] 在另一个实施方案中,所述洗涤剂包含一种或多种离子型表面活性剂例如十二烷基硫酸钠或西曲溴铵。

[0047] 应理解的是,测定试剂可以任何顺序加在一起,前提是在所述测定起始前不发生色原的光谱可检测的变化。例如,所述试剂可以各种稳定的组合预混合并与样品放在一起以进行所述测定。

[0048] 抗菌剂可与一种或多种试剂或试剂混合物包括在内以充当防腐剂。合适的成分包括例如三氯生或硫柳汞。

[0049] 在一个实施方案中,提供了第一试剂混合物和第二试剂混合物并且所述测定通过形成待测定样品与所述第一试剂混合物和第二试剂混合物的混合物来进行。

[0050] 在一个实施方案中,所述第一试剂混合物包含血红蛋白和催化产生过氧化氢作为反应产物的反应的酶,所述第二试剂混合物包含一种或多种色原和用于所述第一混合物的酶的底物。合适地所述酶包含葡萄糖氧化酶并且所述酶的底物包含葡萄糖。

[0051] 在另一个实施方案中,的一种或多种色原连同血红蛋白和催化产生过氧化氢作为反应产物的反应的酶包含在所述第一试剂混合物中。

[0052] 在一个实施方案中,组分测定试剂中的一些或全部可以干燥形式组合并接着加入

含水样品中以进行所述测定。

[0053] 合适地,测定试剂组合可以溶液制备并在固体表面例如纸或测定条上冷冻干燥。

[0054] 干燥形式例如这种干燥形式对于储存和便携性是特别方便的,并且相比于现有技术方法其代表了本发明的方法的显著优势,因为这在需要过氧化氢作为试剂之一时是不能实现的。

[0055] 通过参考利用触珠蛋白的已知浓度生成的标准曲线,针对本发明测定方法中形成的触珠蛋白-血红蛋白复合物确定的过氧化物酶活性水平可与样品中触珠蛋白的水平关联。

[0056] 用于本发明的方法的试剂盒可合适地包含另外的组分例如具有已知触珠蛋白浓度的血清的标准品。

[0057] 在一个实施方案中,本发明的测定方法可合适地利用设备如试管或微量滴定板来进行。或者,所述测定可利用自动化生化分析仪来进行。

[0058] 在整个本说明书的描述和权利要求中,词语“包含”和“含有”以及所述词语的变体,例如“包括”和“含”,意指“包括但不限于”并且不排除其它的部分、添加物、组分、整数或步骤。

[0059] 在整个本说明书的描述和权利要求中,除非上下文另外需要,否则单数涵盖复数。特别地,当使用不定冠词时,除非上下文另外需要,否则本说明书应理解为考虑复数和单数。

[0060] 本发明各方面的优选特征可如关联任何其它方面所述。本发明的其它特征根据以下实施例可变得显而易见。

[0061] 一般而言,本发明延伸到本说明书(包括任何随附权利要求和附图)中公开的特征的任何新的发明或任何新组合。因此,除非与之不兼容,否则与关联本发明特定方面、实施方案或实施例描述的特征、整数、特性、化合物、化学部分或化学基团应理解为适用于本文所述的任何其它方面、实施方案或实施例。

[0062] 此外除非另外指出,否则本文公开的任何特征可被提供相同或相似目的的备选特征所代替。

[0063] 现将通过参考以下的非限制性实施例的方式来进一步阐述本发明。

实施例

[0064] 使用以下溶液和一般程序 -

储液 :-

试剂 A :血红蛋白和葡萄糖氧化酶

磷酸盐缓冲液 0.05M pH 7.4

在超纯水中依照Makimura和Susuki (1982. Jap J Vet Sci 44:15-21) 制备的 30 mg/ml 马血红蛋白

含 10 mg/ml 葡萄糖氧化酶 (Sigma) 的磷酸盐缓冲液

试剂 B :色原 / 葡萄糖

储液 :-

柠檬酸盐缓冲液 0.5 M, pH 3.8

磷酸盐缓冲液 0.05 M, pH 7.4

氯化钠 0.15 M, 1% (v/v) tween 20 (盐水 /tween)

含 158mM 4- 氨基安替比林 (AAP) 的盐水 /tween

含 33mM 8- 苯胺基 -1- 萘磺酸 (ANS) 的盐水 /tween

含 1.1M 苯酚的盐水 /tween

含 65 mM 二硫苏糖醇 (DTT) 的盐水 /tween

含 129.65mM 半胱氨酸 (Cys) 的盐水 /tween

含 0.5M 葡萄糖 (Glu) 的磷酸盐缓冲液

样品

作为空白的水

胎牛血清 (FCS), 作为阴性对照血清 (Sigma)

作为阴性对照的牛血清白蛋白 2% (w/v) (BSA) (Sigma)

含 1.4 mg/ml 触珠蛋白的牛血清

牛和犬的血清样品

程序

在开发期间, 为了于原理的证明和测定试剂的优化, 程序在室温下在微量滴定板的孔中进行, 在 10 或 20 分钟后在 ELISA 板读数仪 (Ultrastar, BMGLabtech) 中于 600nm 处读取吸光度。此后开发在 37℃ 下在自动化生化分析仪 (MIRA, Roche) 或 Prestige 分析仪 (Triodiagnostic Ltd) 上进行。

[0065] 实施例 1: 在微量滴定板上

试剂 A

将马血红蛋白储液的 50 μ l 等分试样加入 25ml 磷酸盐缓冲液中。将 1.25 ml 葡萄糖氧化酶储液加入 10ml 已稀释的血红蛋白溶液中。

[0066] 试剂 Bi

向含 1% Tween 20 的 1.0ml 柠檬酸盐缓冲液 pH3.8 中加入 0.01ml AAP ; 0.02ml 苯酚 ; 0.03ml ANS ; 0.006ml DTT。

[0067] 试剂 Bii

向 1.0ml 磷酸酸盐缓冲液 pH7.4 中加入 0.01 ml AAP ; 0.02ml 苯酚 ; 0.03 ml ANS ; 0.006ml DTT。

[0068] 工作试剂 B

将 1ml 试剂 Bi 与 1ml 试剂 Bii 混合并加入 0.56 ml 含 0.5M 葡萄糖的磷酸盐缓冲液。

[0069] 将样品 (6 μ l) 置于孔中随后加入 100 μ l 血红蛋白 / 葡萄糖氧化酶试剂 A 和 100 μ l 色原试剂 B, 在室温下孵育 10 分钟并在 ELISA 读数仪上于 595 nm 处测量吸光度。

[0070] 所得结果示于下表 1 中。

[0071] 表 1

样品	A595nm
牛血清 (Hp=1.4mg/ml)	2.61
BSA2%(w/v)	0.16
水	0.17

血清中的触珠蛋白在反应中产生深蓝色而 FCS 和水给出极小的反应。

[0072] 实施例 2 DTT 与 Cys 作为还原剂的比较

DTT 已知是试剂混合物中最不稳定的,能够还原 SS 双键的备选试剂会增强触珠蛋白测定的稳定性。

[0073] 在比较半胱氨酸和 DTT 在抑制背景过氧化物酶活性的有效性的实验中,将样品 (4 μ l) 置于孔中接着加入 75 μ l 血红蛋白 / 葡萄糖氧化酶试剂 A 和 75 μ l 色原 Bi DTT 或 Bii Cys,在室温下孵育 30 分钟并在 ELISA 读数仪上于 600 nm 处测量吸光度。

[0074] 工作溶液

工作试剂 A

向 2.5ml 磷酸盐缓冲液中加入 5 μ l 血红蛋白和 30 μ l 葡萄糖氧化酶溶液。

[0075] 工作试剂 Bi DTT

10ml 柠檬酸盐缓冲液 +10ml 磷酸盐缓冲液 (pH 4.1)

接着按每 1ml 混合缓冲液加入 :

0.01ml AAP

0.03 ml ANS

0.02ml 苯酚

0.006 ml DTT

0.25 ml Glu

工作试剂 Bii Cys

10ml 柠檬酸盐缓冲液 +10ml 磷酸盐缓冲液 (pH 4.1)

接着按每 1ml 混合缓冲液加入 :

0.01ml AAP

0.03 ml ANS

0.02ml 苯酚

0.012 ml Cys

0.25 ml Glu

所得结果示于下表 2 中。

[0076] 表 2

A 600nm		
	B1DTT	B2Cys
牛血清 (Hp=1.4mg/ml)	1.86	1.71
FCS	0.19	0.20
水	0.16	0.17

结果显示用半胱氨酸作为还原剂以抑制背景过氧化物酶活性与 DTT 同样有效。

[0077] 实施例 3 :pH 优化

(a) pH 3.9-4.5

在微量滴定板测定上确定改变 pH 对触珠蛋白反应的影响。试剂 B 的缓冲液通过将如下 (表 3) 的柠檬酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液混合并加入如使用 DTT 作为还原剂的实施例 2 中的 Bi DTT 的其它化学物来制备。

[0078] 在加入所有化学物后确定缓冲液混合物 (B2-B5) 的 pH。将样品 (5 μ l) 置于孔中接着加入 90 μ l 血红蛋白 / 葡萄糖氧化酶试剂 A 和 90 μ l 色原 B3-B6,在室温下孵育 20 分

钟并在 ELISA 读数仪上于 600 nm 处测量吸光度。

[0079] 表 3 :反应缓冲液的 pH

试剂	柠檬酸盐缓冲液体积 ml	磷酸盐缓冲液体积 ml	测量的 pH
B2	10	0	3.95
B3	7.5	2.5	4.01
B4	5	5	4.10
B5	2.5	7.5	4.44

所得结果示于下表 4 中。

[0080] 表 4 :20 分钟的吸光度 (A 600nm)

	B2pH3.95	B3pH4.01	B4pH4.10	B5pH4.44
牛血清 (Hp=1.4mg/ml)	0.61	0.59	1.06	1.48
FCS	0.19	0.83	0.63	0.16
水	0.16	0.17	0.55	0.15

从结果中可看出在 4.1 和 4.4 的 pH 下触珠蛋白具有最高的反应并且在 pH4.44 下空白和阴性血清样品中反应最小。

[0081] (b) pH 4.1-6.0

如表 5 中列出的不同 pH 的缓冲液 (B6-B10) 通过用 pH 3.8 柠檬酸盐缓冲液滴定 pH 7.4 磷酸盐缓冲液并加入如实施例 2 试剂 B_i DTT 的试剂来制备。将样品 (4 μl) 置于孔中接着加入 75 μl 血红蛋白 / 葡萄糖氧化酶试剂 A 和 75 μl 色原 B2-B5, 在室温下孵育 30 分钟并在 ELISA 读数仪上于 600 nm 处测量吸光度。

[0082] 表 5 :反应缓冲液的 pH

	B7pH4.14	B8pH4.5	B9pH4.99	B10pH5.48	B11pH5.98
	B7pH4.14	B8pH4.5	B9pH4.99	B10pH5.48	B11pH5.98
牛血清 (Hp=1.4mg/ml)	1.13	.53	.20	.20	.18
FCS	.29	.24	.22	.21	.19
水	.19	.23	.19	.19	.18

发现在 pH4.5 以上反应并不进行。

[0083] 在 pH4.14 和 4.5 下有反应并且该组试剂中在 pH 4.14 下反应更优越。

[0084] 实施例 4: 自动化分析

将微量滴定板上优化的试剂依照以下方法用于自动化生化分析仪 (MIRA, Roche) 上:-

试剂 A

向 9ml 磷酸盐缓冲液 (0.05M, pH 4.51) 中加入 18 μl 血红蛋白和 108 μl 的葡萄糖氧化酶溶液。

[0085] 试剂 B

将 15ml 0.05M 磷酸盐缓冲液 pH 7.4 用 pH 3.8 的 0.5M 柠檬酸盐缓冲液 (约 5.3ml) 滴定至 pH 4.14

按每 1ml 混合缓冲液加入以下试剂:

0.01ml AAP

0.03 ml ANS

0.02ml 苯酚

0.006 ml Cys

0.25 ml Glu

在 MIRA 分析仪上将试剂 A 作为第 1 试剂放置并将试剂 B12 作为第 2 试剂加入。设置测定参数使得

样品体积 = 0.0052ml

第 1 试剂 (A) = 0.09ml

第 2 试剂 (B12) = 0.09ml

添加应为第 1 试剂, 加入样品, 加入试剂 B12 并在循环 1-15 (相隔 25 秒) 于 600nm 处读数。循环 2 与循环 15 之间 (350 秒) 600nm 处的吸光度的变化为读数 (ΔA_{600})

样品:

血清中的 Hp 在 1.4g/L、0.7g/L、0.35g/L 和 0 g/L 的标准曲线

盐水、FCS、4%(w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 的对照

样品: 具有升高的 Hp 浓度的血清。

[0086] 所得结果示于表 6 中。

[0087] 表 6: 自动化分析

	ΔA_{600}	Hpg/l*
标准品 1.4g/l	0.7488	
标准品 0.7g/l	0.3411	
标准品 0.34g/l	0.1451	
** 标准品 0.0g/l	0.0039	
盐水	0.0039	0
4%BSA	0.0048	0.02
FCS	0.0050	0.02
样品 1, 犬	0.4394	0.92
样品 2, 猫	0.3889	0.83
样品 3, 牛	0.6272	1.25
样品 4, 猪	0.7029	1.39

* 通过分析仪从标准品计算出的

** 超纯水

用葡萄糖氧化酶和葡萄糖以产生用于测定系统的过氧化物的试剂生成了触珠蛋白标准品的线性曲线和自动的结果输出。在分析中用 4% 白蛋白和 FCS 残留背景活性观察到的低水平表观触珠蛋白, 可如现有测定方法中那样通过将这些 (4% BSA 或 FCS) 中的任一个用作零标准品来克服。

[0088] 实施例 5 触珠蛋白的干燥化学试验

在无需提供过氧化物用于反应的情况下, 试剂可以干燥化学形式使用。为了使试剂的相互作用在干燥前最小化, 将它们依次加入并在加入最终试剂后立即冷冻, 然后真空干燥 (冻干)。

[0089] 如实施例 1 中的试剂 A

如实施例 1 中的试剂 B

将试剂 A (0.025 ml) 点状分配在滤纸 (Biorad) 上, 使之风干并将其在塑料袋中的干冰上放置 60 分钟。将冰冷的试剂 B (0.025ml) 点状分配在之前分配的试剂 A 上, 重新置于在塑料袋中的干冰上 30 分钟。将滤纸置于冷冻干燥器中过夜。

[0090] 将含 0.74 和 0.35 g/l 触珠蛋白 (实施例 4 中所用 1.4 g/l 标准品的 1:2 和 1:4 稀释物) 的牛血清 (0.01 ml) 和 5 g/l 和 2.5 g/l 的 BSA 置于干燥的点上并孵育约 5 分

钟,通过扫描记录显色情况。

[0091] 当在滤纸上干燥时新试剂用含触珠蛋白的样品施用 5 分钟生成深蓝色 / 紫色反应,但用 BSA 则生成阴性反应。

[0092] 实施例 6 优化的湿化学测定 牛样品

进行了进一步的优化研究,其涉及试剂浓度的调整并在试剂 A 中使用氨基安替比林。Prestige(Triodiagnostic Ltd) 生化分析仪用于确定牛血清样品中的触珠蛋白。

[0093] 试剂 A:血红蛋白 / 葡萄糖氧化酶 / 氨基安替比林

溶解于去离子水中:

氯化钠 (Sigma)	0.154 M
葡萄糖氧化酶 (Sigma)	0.6 mg/ml (105 U/ml)
马血红蛋白	0.26 mg/ml
4-氨基安替比林 (Sigma)	3.1 mM
三氯生 (Fluka)	0.0001%(v/v)

试剂 B

溶解于去离子水中并具有 4.1 的 pH

柠檬酸 (Sigma)	0.06 M
磷酸氢二钠 (Fluka)	0.08 M
葡萄糖 (Sigma)	0.5 M
Tween 20(Sigma)	1% (v/v)
苯酚 (Sigma)	0.02 M
8- 苯胺基 -1- 萘磺酸 (Fluka)	1.5 mM
L- 半胱氨酸 (Sigma)	0.82 mM
三氯生 (Fluka)	0.0001 % (v/v)

Prestige 分析仪方案:-

样品:4 μ l

水稀释剂:10 μ l

试剂 1= A2:200 μ l

试剂 2= B13:90 μ l

空白:正常牛血清

校准品:含 1.48 g/L、0.74 g/L、0.37 g/L、0.19 g/L、0.048 g/L 触珠蛋白的正常牛血

清

计算模式:Logit 2

所得结果示于表 7 中

表 7

	ΔA_{600}	Hpg/l*
标准品 1.48g/l	0.1759	
标准品 0.74g/l	0.3069	
标准品 0.37g/l	0.4843	
标准品 0.19g/l	0.8635	
标准品 0.048g/l	1.9117	
空白 (NBS) 0.0g/l	0.1303	

胎牛血清		0.00
样品 1		0.00
样品 2		0.02
样品 3		0.42
样品 4		0.57
样品 5		0.49

* 基于标准品的 ΔA_{600} 通过机载计算机计算出的 Hp 浓度

样品 1-5 来自在急性期反应期间的小牛。

[0094] 实施例 7 优化的湿化学测定 犬样品

将如实施例 6 中的试剂用于 Pentra 400 (Horiba Abx Ltd) 分析仪上以确定犬血清样品中的触珠蛋白。将样品在分析前以 1:10 稀释于 0.9%(w/v) NaCl 中并以一式两份分析。给出的结果在计算后针对稀释度进行调整并且为该重复的平均值。

[0095] Pentra 分析仪方案 :-

样品 :7.5 μ l

水稀释剂 :5 μ l

试剂 1= A2 :150 μ l

试剂 2= B13 :60 μ l

空白和校准品稀释剂 :2%(w/v) 牛血清白蛋白 (BSA)

氯化钠 (Sigma) 0.154M

BSA Frac V (Sigma) 20.0g/L

三氯生 (Fluka) 0.0001%(v/v)

校准品 : 按 1.48 g/L、0.74 g/L、0.37 g/L、0.19 g/L 稀释于校准稀释剂中的触珠蛋白,

计算模式 :Logit/Log4

所得结果示于表 8 中

表 8

	ΔA_{600}	Hpg/l*
标准品 1.48g/l	3.0938	
标准品 0.74g/l	1.9997	
标准品 0.37g/l	1.0009	
标准品 0.19g/l	0.5719	
空白 (2%BSA)0.0g/l	0.1029	
样品 6		0.05
样品 7		0.75
样品 8		4.7
样品 9		6.65

* 基于标准品的 ΔA_{600} 通过机载计算机计算出的 Hp 浓度

样品 6-7 来自具有健康狗中存在的范围的触珠蛋白的狗,样品 8-9 来自炎症病况或感染病况的狗。