[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1094061A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93120541.7

[51]Int.Cl[5]

[43]公开日 1994 年 10 月 26 日

C07K 15/28

[22]申请日 93.11.17

[30]优先权

[32]92.11.17[33]DE[31]P4238705.1

[32]93.3.31 [33]DE[31]P4310500.9

[71]申请人 曼海姆泊灵格股份公司

地址 联邦德国曼海姆

[72]发明人 J·卡尔 A·芬克

W·D·恩格尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴大建 姜建成

C07K 15/06 C12P 21/08

G01N 33/53 G01N 33/72

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 同时测定HbALc和类似于HbALc并具有糖基化作用的血红蛋白变异体

[57]摘要

本发明涉及用识别 $HbAl_C$、$HbSl_C$ 和 $HbCl_C$ 的抗体免疫测定血样中糖基化血红蛋白含量的方法、在该方法中所用的抗体以及制备这种抗体的方法。

权利要求书

1、可识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 并能通过用至少一种含有糖基化寡肽果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu、果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原成分的免疫原进行免疫制备的抗体用于同时免疫测定 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$。

2、如权利要求 1 所述的用途，其中的免疫测定是根据凝集试验原理或按照 CEDIA、EMIT、FPIA 或 ELISA 技术进行的。

3、可识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$、和 $HbCl_c$ 的抗体，该抗体通过用含有糖基化寡肽果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu 和/或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原成分的免疫原免疫哺乳动物后从被免疫动物的血清中分离抗体而获得。

4、识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 的抗体，该抗体通过用含有果糖－Val－His－Leu－Thr 作为半抗原成分的免疫原与至少一种含有果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu 和/或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原成分的其它免疫原的混合物免疫哺乳动物后从被免疫动物的血清中分离抗体而获得。

5、如权利要求 3 或 4 所述的抗体，其中该抗体是单克隆抗体，可以通过用权利要求 3 或 4 中提及的免疫原之一免疫、使被免疫动物的脾细胞永生、克隆那些产生所需抗体的永生细胞和根据已知方法分离抗体而获得。

6、制备可识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 抗体的方法，其中用含有糖基化寡肽果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu 或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原成分的免疫原或用两种这类免疫原的混合物免疫哺乳动物后从被免疫动物的血清中分离抗体。

7、制备可识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 单克隆抗体的方法，其中用含有糖基化寡肽果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu 或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原成分或用两种这类免疫原的混合物免疫哺乳动物、使免疫动物的脾细胞永生、克隆那些产生所需抗体的永生细胞和根据已知方法分离抗体。

8、如权利要求 6 或 7 之一所述的方法，其中所用免疫原中的半抗原成分被结合到作为载体蛋白的 KLH 上。

9、如权利要求3-5中所述免疫测定N末端糖基化血红蛋白含量的抗体用于同时测定血样中 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 含量的方法中。

10、用于免疫测定 N 末端糖基化血红蛋白的试剂，其中含有至少一种如权利要求 3—5 之一所述的抗体。

11、用如权利要求 3—5 中所述的抗体同时免疫测定 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 的方法。

说 明 书

同时测定 $HbAl_c$ 和类似于 $HbAl_c$ 并具有糖基化作用的血红蛋白变异体

本发明涉及用识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 的抗体免疫测定血样中糖基化血红蛋白含量的方法以及制备上述抗体的方法。

血红蛋白运输氧和 CO_2，它定位于红细胞中，由四条蛋白链组成，其中的两条在各种情况下都具有相同的结构。在任何情况下，血红蛋白都主要由两条非糖基化的 α 和 β 链组成。通常，血液中90%以上的血红蛋白是以表示为 HbAo 的形式存在。

人们已知，具有改变了氨基酸顺序的血红蛋白的 α 链及 β 链的变异体会损害血红蛋白分子的运输功能，并异致所谓的血红蛋白病。在血红蛋白病中最为人们熟知的是镰状细胞贫血，它是由疏水性缬氨酸替代了 β 链第 6 位上的亲水性谷氨酸。该替代过程的发生导致替代的缬氨酸与 β 链第 1 位上的缬氨酸之间产生疏水性环化作用。该结构引起含有这种被改变的 β 链的 HbS 分子聚积，进而影响该被改变的血红蛋白的运输功能。另外一种病理性血红蛋白 HbC 不同于 HbA 也在于在 β 链第 6 位上发生了一个氨基酸取代。此时是赖氨酸取代了谷氨酸。除此之外，还已知具有一个明确氨基酸取代的大量其他血红蛋白变异体（例如 HbA_2，HbE）。

由这些血红蛋白变异体与葡萄糖在体内借助非酶学反应形成糖基化的血红蛋白衍生物。该非酶学糖基化作用是一种缓慢、连续的反应过程，它不可逆地进行并且主要依赖于血糖浓度。在糖基化作用过程中，在葡萄糖的醛基与血红蛋白的游离氨基酸之间形成席夫碱。所形成的醛亚胺借助 Amadori 重排而重排形成 N—(1—脱氧—D—果糖—1—基)残基。以该重排形式存在的糖基化血红蛋白是稳定的。

通常形成的糖基化血红蛋白被表示为 $HbA1_c$。前文提到的糖基化血红蛋白变异体表示为 $HbSl_c$ 或 $HbCl_c$。这些糖基化血红蛋白是由位于血红蛋白 β 链 N 末端上的缬氨酸或赖氨酸的游离氨基的糖基化作用形成的。各种血红蛋白变异体在该过程中与正常 HbA_o 在同样程度上被糖基化(J. Sosenko et al，Diabedtes Care 3，1980，590—593)。

血液中糖基化血红蛋白的浓度依赖于血糖浓度。成人中糖基化的血红蛋白与总血红蛋白的比例正常是在 3—6%的范围内。当血糖水平增高时，该比例增至 15%。因此，测定 N 末端糖基化血红蛋白的比例是监测血糖水平的可靠指标。因为红细胞所具有的平均半衰期为 120 天，所以测定血液中的糖基化血红蛋白提供了一个不依赖于血糖短期增加(如食用富含碳水化合物的饮食后)的血糖水平指标。

因此，测定血液中的糖基化血红蛋白对于诊断和监测糖尿病具有重要意义。因而，已开发了许多用于检测 $HbA1_c$ 的色谱和电泳方法。然而，利用这些方法不能够同时测定糖基化的血红蛋白与 $HbA1_c$(J. Sosenko et al. Diabetes Care 3, 1980, 590—593; D. Gold-

stein et al., CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 21, 1984, 187－225; Allen et al., Annul Clinical Biochemistry 29, 1992, 426－429)。尽管除 $HbAl_c$ 之外糖基化血红蛋白变异体如 $HbSl_c$ 或 $HbCL_c$ 也用亲和层析法同时测定，但该方法对发生于β链N末端的糖基化作用不具特异性，因为所有血红蛋白分子的糖基化作用(例如在赖氨酸残基上或在α链上)都同等被检测(D. Goldstein et al., CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 21, 1984, 187－225)。因此，用层析法在患有上文提及的血红蛋白病之一的病人中测定N末端糖基化血红蛋白比例的值太低，而亲和层析法一般检测较高的值。所以，这些现有技术的方法不能用于用患有血红蛋白病患者的血样诊断和监测糖尿病。

现已意外地证明，用含有糖基化的寡肽果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 或其部分作为半抗原成分的免疫原进行免疫获得的抗体可以获得能识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCL_c$ 并适用于免疫测定 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 的方法中的抗体。

因此，本发明涉及应用能识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 并能利用至少一种含有糖基化寡肽果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu、果糖－Val－His－Leu－Thr 和/或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗体原成分的免疫原进行免疫获得的抗体，同时免疫测定 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$。

经上述途径产生的抗体能识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 的这一事实也特别令人意外，因为在 HbS 和 HbC 的β链第6位上发生的氨基酸取代同样导致由抗体识别的表位区域的三级结构的改变，继而将可以预料用上文提及的免疫原获得的抗体将在 $HbAl_c$、Hb-

Sl_c 和 $HbCl_c$ 之间有所区别。

借助于所有现行的免疫测定法，例如 ELISA、荧光免疫测定法、放射免疫测定法、荧光一偏振免疫测定法(FPIA)、克隆酶供体免疫测定法(CEDIA)或酶多重免疫测定技术(EMIT)可以用上述抗体对 N 末端糖基化血红蛋白 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 同时进行免疫测定。该方法中可进行均相测定(如作为竞争性浊度免疫测定)，也可进行非场相测定。

该测定最好是根据凝集试验例如 TINIA 或胶乳颗粒增强的免疫测定法(LPIA)的原理进行。这些都是竞争性试验，其中来自样本的抗原与多半抗原竞争，该试验中存在结合到高分子载体蛋白上的数种半抗原，以结合到特异性抗体。最好是用进行免疫的半抗原(优选是果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为结合到高分子载体上的半抗原。不存在来自样本的抗原时，上述免疫原由该试验中所用的抗体所交联以形成在该试验溶液中引起一定浊度的大凝集块。高分子多半抗原由抗原从上述凝集物中置换出来，置换量对应于样本中抗原量。结果，试验溶液的浊度与抗原量成比例降低。通过与加入已知量的糖基化血红蛋白所观察到的浊度降低相比较，就有可能测定样本溶液中的糖基化血红蛋白($HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$)的含量。为此，$HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 一般可以单独或作为混合物使用。

此外，最好是根据 CEDIA、EMIT、FPIA 或 ELISA 技术实施本发明的方法。

在 CEDIA 技术中，来自待分析样本的抗原本身引起无活性的酶受体与酶供体缔合，形成有活性的酶，因此其酶活性与待分析样

本中的抗原量成比例(Henderson et al, Clinical Chemistry 32, 1986, 1637—1641)。某些酶,如β—半乳糖苷酶被用于该试验中并以均不具酶活性的两种成分存在,也就是说一个大的多肽(酶受体)和一个小的多肽(酶供体),这些成分自发缔合形成一个酶活性蛋白。将作为分析物被检测的半抗原结合到酶供体上,其方式应使酶供体与酶受体缔合而形成活性酶的过程不会因半抗原的这种结合而受阻。然而,当抗抗原的抗体结合到抗原—酶供体复合体上时,上述缔合过程受到抑制。因此,在有酶受体、抗原—酶供体复合体和相应的抗体存在的试剂溶液中,没有活性酶形成,也检测不到酶活性。在加入样本液后,来自样本液中的抗原置换出结合到抗原—酶供体复合体中的抗体,因而能形成活性酶。

在酶多重免疫测定技术(EMIT)中,待检半抗原与标记酶共价偶联,其方式应以维持酶活性为准。然而,当抗体结合到半抗原成分上后,结合在酶上的底物受到空间位阻,以致底物的酶促转化不能产生。正如在 CEDIA 技术中的情况一样,来自待测样本液中的抗原在这种情况下也从酶结合的半抗原中置换出抗体,因此能分析样本液中与抗原浓度成比例的酶活性(Gunzer et al., "Kontakte III, 1980, 3—11; K. Rubenstein, Biochemical and Biophysical Research Communications 47, 1972, 846—851)。

在荧光—偏振免疫测定(FPIA)中,用一种荧光物质标记待测半抗原。这些分子吸收光能后在约 10^{-8}秒的期间内作为更长波长的光释放。如果荧光团被偏振光激发,那么发射光的偏振程度依赖于示踪物(分析物—荧光团接合物)的旋转速度。示踪物与抗体的结合妨碍荧光团的旋转。游离的示踪物比更大的、更具惰性的抗体

-示踪物复合体旋转更快且使激发光去偏振更多。样本中存在的分析物越多，所形成的抗体-示踪物复合体就越少，并且检测到荧光偏振也就越少（W. Dandliker et al., Journal of Exp Med. 122, 1965, 1029）。

在以 ELISA 原理为基础的免疫测定中，通过检测固相中的酶标记物来测定酶标抗体与来自待测样本液、于检测反应之前或之中固定的抗原的结合。

此外，本发明涉及识别 $HbA1_c$、$HbS1_c$ 和 $HbC1_c$ 的单克隆和多克隆抗体，这些抗体可以通过用含有糖基化的寡肽果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu 或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原折免疫原进行免疫并用已知的方法从被免疫的动物血清中分离抗体而获得。

更进一步的主题是可通过下列方法获得的单克隆和多克隆抗体，即用含有果糖－Val－His－Leu－Thr 作为半抗原的免疫原与至少一种含有果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu 和/或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原成分的另一种免疫原的混合物免疫哺乳动物，并从免疫的动物血清中分离抗体。

本发明优选的主题是识别 $HbA1_c$、$HbS1_c$ 和 $HbC1_c$ 的单克隆抗体，这些抗体可以通过用所说的免疫原免疫、使被免疫动物的脾细胞永生、克隆那些能产生所需抗体的永生细胞并按已知方法从产生抗体的细胞中分离抗体而获得。

用类似于 EP－A0329994（亦属本专利申请公开的主题）中所描述的方法能够制备免疫原。在该过程中，半抗原被结合到载体蛋白如 KLH（锁眼蝾血兰蛋白）、β－半乳糖苷酶或麻仁球蛋白上，

KLH 优选用作载体蛋白。借助于偶联基团如赖氨酸、半胱氨酸和马来酰亚氨基己基，KLH 易于偶联半抗原和载体蛋白。

特别优选的是应用具有高包被密度(被结合的半抗原基团数相当于载体蛋白重量的 5—25%)的免疫原。借助该方法制备高血清滴度的抗血清。高血清滴度的含义应理解为所得的多克隆抗血清能够以高稀释比例(1：8，优选 1：10 及更高)应用于糖基化血红蛋白的测定。

然后，根据本领域技术人员已知的方法用上述免疫原免疫通常用来获取抗体的动物。优选的是兔或羊，或者是在制备单克隆抗体的情况下优选小鼠。多克隆抗体可以直接加以应用，或者最好是在经 DEAE 层析纯化后或经免疫吸附纯化后使用。单克隆抗体可以用一般方法使免疫动物的脾细胞永生、克隆那些产生所需抗体的永生细胞和根据已知方法分离抗体而获得。

同样优选的是将至少两种含有果糖—Val—His、果糖—Val—His—Leu、果糖—Val—His—Leu—Thr 和果糖—Val—His—Leu—Thr—Pro 作为半抗原成分的免疫原的混合物用于免疫。

以常规方式借助 ELISA 试验检测与 $HbA1_c$、$HbS1_c$ 以及如果需要的话与 $HbC1_c$ 的结合而鉴定产生所需抗体的永生细胞。

此外，本发明涉及制备识别 $HbA1_c$ 及 $HbS1_c$ 和 $HbC1_c$ 抗体的方法，其中包括用含有糖基化寡肽果糖—Val—His、果糖—Val—His—Leu 或果糖—Val—His—Leu—Thr—Pro 作为半抗原的免疫原或至少两种上述免疫原的混合物进行免疫，并根据已知方法从被免疫动物的血清中分离抗体。

本发明优选的主题是制备识别 $HbA1_c$、$HbS1_c$ 和 $HbC1_c$ 的单克

隆抗体的方法，其中包括用含有糖基化寡肽果糖－Val－His、果糖－Val－His－Leu 或果糖－Val－His－Leu－Thr－Pro 作为半抗原的免疫原或至少两种上述免疫原的混合物进行免疫、使免疫动物的脾细胞永生、克隆那些产生所需抗体的永生细胞并根据已知方法从克隆的细胞中分离抗体。

本发明特别优选的主题是根据本发明制备识别 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 的多克隆或单克隆抗体的这种方法，其中应用半抗原成分被结合到作为载体蛋白的 KLH 上的免疫原。

此外，本发明还涉及本发明免疫测定糖基化血红蛋白含量的抗体在同时免疫测定血样中 $HbAl_c$ 以及糖基化血红蛋白变异体如 $HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 含量的方法中的应用。

本发明抗体还识别其它的 Hb 糖基化变异体，如 $HbA2_{1c}$和 $HbE1_c$。

此外，本发明还涉及用于免疫测定 N 末端糖基化血红蛋白含量的试剂，其中含有至少一种本发明的抗体以及用本发明的抗体对 $HbAl_c$、$HbSl_c$ 和 $HbCl_c$ 同时进行免疫测定的方法。

下面的实施例将更为详尽地说明本发明。

实施例 1

制备获得抗 $HbAl_c$ 型糖基化血红蛋白抗体的免疫原

1.1 β－半乳糖苷酶作为载体蛋白的应用

根据 EP－A0329994 中的描述，借助在半自动肽合成仪(Labortec Company, Bubendorf, Switzerland)上进行的固相合成法合成肽果糖－Val－His－Leu－Thr－Lys－OH 并将其结合到 β－半乳糖苷酶上。为此，将 10mg 果糖－Val－His－Leu－Thr－Lys－

OH 溶于 1ml 0.1 摩尔/升磷酸钾缓冲液(pH7)中，并加至溶于 2ml 乙醇的 6.2mg 马来酰亚氨基己酸—N—羟基琥珀酰亚氨基酯中。反应液于室温下搅拌 14 小时后在 Polycosil C18 上纯化，并冻干 HPLC 纯化馏分。

为制备免疫原，将 48mg β—半乳糖苷酶(β—Gal)(EIA 质量，Boehringer Mannheim GmbH，目录号 570079)在通入氩气的条件下溶解于 2ml 0.1mol/l 的磷酸钾缓冲液(pH7.0)中，并在无氧情况下加入 5mg 冻干肽果糖—Val—His—Leu—Thr—Lys(MH)—OH 后于室温搅拌 1 小时。随后将整个反应液放入用氩饱和 0.09%氯化钠溶液平衡过的 AcA 202 柱(2×24cm，Pharmacia，Sweden)中。接着，用同样的平衡缓冲液洗脱，并收集含所需免疫原的蛋白馏分。利用样品与 Ellman 试剂的反应检测用半抗原基团包被 β—半乳糖苷酶的情况。

免疫原果糖—Val—His—Lys—(MH)—βGal、果糖—Val—His—Leu—Lys—(MH)—βGal 和果糖—Val—His—Leu—Thr—Pro—Lys—(MH)—βGal 用类似的方式制备。

1.2 KLH 作为载体蛋白的应用

根据 EP—A 0329994 中的描述，借助在半自动的肽合成仪(Labortec Company，Bubendorf，Switzerland)上进行的固相合成法合成半抗原果糖—Val—His—Leu—Thr—Cys—OH。

载体蛋白锁眼[illegible]血兰蛋白(KLH)与马来酰亚氨基己酰—N—羟基琥珀酰亚胺(MHS)进行反应。为此，将 2gKLH 溶解于 0.1mol/l 碳酸氢钠(pH8.35)中。离心分离不溶性蛋白质部分。继而用 0.1mol/l NaOH 将溶液的 pH 值调节至 8.30。将溶解于 3ml DMSO

中的 370mg 马来酰亚氨基己酰—N—羟基琥珀酰亚胺加入该蛋白溶液中。于室温反应 15 分钟后，用 0.1mol/l HCl 调 pH 值至 7.0，借助用 Ultrogel AcA 202(2×24cm，Pharmacia，Sweden)进行的凝胶渗透层析纯化产物。根据 EP—A 0329994(实施例 4)利用 Ellman 试剂测定所得产物中马来酰亚氨基己酰基的数目。作为常规，可达到每摩尔 KLH 负载 600—900 个马来酰亚氨基己酰基。

将用上述途径获得的 KLH 衍生物用氩净化约 15 分钟。然后按每摩尔马来酰亚氨基己酰基加入 2 摩尔肽半抗原，并在室温中保温 3 小时。再利用 Ultrogel AcA202(2×24cm，Pharmacia，Sweden)进行的凝胶渗透层析分离未反应的肽而进行纯化。

实施例 2

制备抗 $HbA1_c$ 的多克隆抗血清

2.1 免疫

用根据实施例 1.1 获得的免疫原和福氏(Freud)佐剂免疫 5 只羊。每种情况的剂量为每只动物首次及每次后续免疫用 500μg。用同样的方式免疫另外 5 只羊，但每种情况下每只动物每次免疫用 1mg 免疫原。

用类似的免疫原以同样的方式免疫 10 只羊，但在免疫原中，半抗原被结合到 KLH 上(根据实施例 1.2 产生)，并且每只动物每次免疫也用 500μg 或 1mg。

5 个月(KLH 免疫原)或 6 个月(β—Gal 免疫原)后，从所有的动物中采集血清样本，并利用浊度试验测定所得抗血清的血清滴度。

抗血清试验

所用试剂：

溶血试剂：

20mM MES pH6.0

1% SDS

0.02% 六氰基高铁(Ⅲ)酸钾

0.1% NaN_3

0.5% Brij 35

反应缓冲液

20mM MES pH6.0

150mM NaCl

0.5% Brij 35

0.1% NaN_3

3% PEG 6000

多半抗原溶液：

20mM MES pH6.0

150mM NaCl

0.5% Brij 35

0.1% NaN_3

6% PEG 6000

0.1% BSA

多半抗原 30μg/ml

制备用于检测的抗血清

用二次浓缩的反应缓冲液 1＋1 地稀释血清，于 4℃保温过夜，并经离心分离去除所形成的沉淀。上层清液在冰浴中保温 1 小时，通过 0.22μm 的过滤器过滤，并将 pH 值调至 6.0。如此形成的抗体溶液被直接用于试验中，或进一步用反应缓冲液稀释。

检测

为了评估抗血清的滴度，将抗体溶液与多半抗原溶液混合，并用测光法测定所产生的浊度。在 Hitachi 704 自动分析仪中于 37℃下进行测定。测定过程如下：8μl 溶血试剂和 350μl 抗体溶液混合后保温 5 分钟。继而加入 70μl 多半抗原溶液，再保温 5 分钟。于 340nm（用 700nm 作参考波长）测定这一期间形成的浊度作为吸光度。

2.3　结果

结果总结于表 1（β—Gal 免疫原）和 2（KLH 免疫原）中。许多动物表现出 500mA 的检测信号并且在低抗血清稀释比例（1：2/1：4）下更高。在抗血清稀释比例为 1：8 时，上述检测信号仅适用于一只经 β—Gal 免疫的动物，而 8 只用 KLH 免疫的动物情况却都如此。甚至在该稀释比例下这些血清中的大多数仍产生很高的检测信号并且显然可在高稀释比例下用于测定糖基化血红蛋白。用于免疫的免疫原剂量对血清滴度不产生任保可识别的影响。

表 1

应用结合到β－半乳糖苷酶上的肽半抗原进行免疫所获得的多克隆抗血清时在竞争性免疫测定中的最大检测信号。

动物	免疫原剂量（mg）	抗血清稀释比例为1：2时所检测的信号mA	抗血清稀释比例为1：4时所检测的信号mA	抗血清稀释比例为1：8时所检测信号mA
1	1.0	435	12	0
2	1.0	1261	309	0
3	1.0	77	2	0
4	1.0	205	2	0
5	1.0	887	305	4
6	0.5	1000	417	67
7	0.5	1289	992	650
8	0.5	1100	239	0
9	0.5	848	253	0
10	0.5	228	3	2

表 2

利用结合到KLH上的肽半抗原进行免疫所获得的多克隆抗血清时在竞争性免疫测定中的最大检测信号。

动物	免疫原剂量（mg）	抗血清稀释比例为1：2时所检测的信号mA	抗血清稀释比例为1：4时所检测的信号mA	抗血清稀释比例为1：8时所检测信号mA
11	1.0	1580	1591	1575
12	1.0	1094	532	99
13	1.0	1044	844	356
14	1.0	1306	1548	1619
15	1.0	1620	1707	1696
16	0.5	1194	973	572
17	0.5	1435	1531	1394
18	0.5	1467	1598	1444
19	0.5	1158	1301	630
20	0.5	1486	1575	1608

实施例 3

分离 HbA_o 和 HbS_o 并使 HbS_o 在体外糖基化形成 $HbSl_c$

市售 HbS(Sigma,目录号 H0392)或人红细胞溶血液经层析分离后用如此纯化的 HbS_o 体外与葡萄糖反应形成 $HbSI_c$。

3.1 分离 HbS_o

将得自 Sigma 公司的 HbS 制剂溶解于 50mmol/1 MES(pH6.2)中,继而用同样的缓冲液透析 12 小时。将透析液加入用上述缓冲液平衡过的 S—Sepharose HP 层析柱(Pharmacia Company)中。然后进行 LiCl 梯度洗脱,分离 HbS_o 积分,正如利用 MonoS/$HBA1_c$ 柱(Pharmacia Company)及其测定 $HbAI_c$ 的操作说明进行的 HPLC 分析所显示的那样,其中不含糖基化血红蛋白。

3.2 制备糖基化 HbS

用 100mmol/1 磷酸盐缓冲液(pH6.5)透析部分 HbS_o 积分,继而与 2600 倍摩尔过量葡萄糖反应。37℃保持 20 小时后中止反应,再进一步透析保温混合物以去除葡萄糖。利用 HPLC 分析透析液。层析谱显示出部分 11.1%糖基化的 HbS。

3.3 分离 HbA_o

通过裂解含于蒸馏水中的 PBS 洗涤人红细胞使存在于人红细胞中的血红蛋白释放出来。离心分离去除细胞碎片和红细胞影。如此获得的溶血液用 50mM MES(pH6.2)透析。继而将透析液加入用上述缓冲液平衡过的 S—Sepharose HP 层析柱(Pharmacia Company)中。然后进行 LiCl 梯度洗脱,分离 HbA_o 积分,正如利用 MonoS/$HbAl_c$ 柱(Pharmacia Company)及其测定 $HbAl_c$ 的操作说明进行的 HPLC 分析所显示的那样,其中不含糖基化血红蛋白。

实施例 4

同时测定 $HbA1_c$ 和 $HbSl_c$

首先，用特殊的溶血试剂使全血样本溶血，继而用光度计（BM/Hitachi 717，Boehringer Mannbeim GmbH）经双通道程序检测。借助 340nm 处的浊度检测在一个通道中进行根据 TINIA 试验原则进行的 $HbA1_c$ 免疫测定（g/dl），同时借助 570nm 处的浊度检测在另外的通道中测定总的血红蛋白含量。根据下列公式计算 $HbA1_c$ 含量的百分比：

$$\%HbA1_c = \frac{HbA1_c[g/dl]}{\text{总血红蛋白}[g/dl]} \times 100$$

使用了下列试剂：

1）溶血试剂

20mM　磷酸钠　pH7.4

0.9%　TTAB　（十四烷基三甲基溴化铵）

2）抗体溶液（R_1-$HbA1_c$）：

20mmol　MES 缓冲液 pH6.2[2-(N-吗啉代)—乙烷—磺酸]

150mmol　NaCl

3.0% PEG　6000（聚乙二醇，分子量约 6000）

0.5% Brij^R　35

1.0mg/ml PAb（$HbA1_c$）S—IgG(DE)

（抗 $HbA1_c$ 的多克隆羊抗体），用免疫原果糖—Val—His—Leu—Thr—MH—βGal 所产生

3）多半抗原溶液（R_2-$HbA1_c$）：

20mmol　MES 缓冲液 pH6.2

150mmol　NaCl

6.0%　PEG　6000

0.5%　Brij^{R}　35

30μg/ml　多半抗原[1)]

[1)] 多半抗原：果糖—Val—His—Leu—Thr，如德国专利申请 P. 4140142.5 所述，通过 Cys—马来酰亚氨基乙酸与葡聚糖偶联

4)用于总血红蛋白 (R_1—Hb)测定的缓冲溶液：

20mM　磷酸钠 pH7.4

150mmol/L　NaCl

5)校准液 a—e：

20mmol　磷酸钠 pH7.4

0.9%　TTAB

1.4mg/ml　羊血红蛋白

0、0.05、0.1、0.16、0.3 人 HbA_{1c}

4.1　测定 HbA_{1c}

将溶血试剂以 1＋100 的比例加入样本中，于 25℃保温约 5 分钟。用吸移管将 250μl 抗体溶液(R_1—HbA_{1c})加入 10μl 溶血样本中。于 37℃保温 5 分钟后，于 700/340nm 双色测定样本空白值(A_1)。测定后约 20 秒种，加入 50μl 多半抗原溶液，立即搅拌，于 37℃再保温 5 分钟。然后于 700/340nm 双色测定浊度(A_2)。

根据下列公式计算依赖于样品的吸光度之差：

$$\Delta A = A_2 - K \cdot A_1$$

其中 K 代表体积校正系数

$$K = \frac{V_{样本} + V_{R1}}{V_{总}}$$

用含有 $HbA1_c$ 浓度渐增的校正液 a—e 建立校正曲线并通过依赖于样品的吸光度之差 ΔA 读出样本的未知 $HbA1_c$ 浓度(g/dl)。

4.2 测定总血红蛋白浓度

在 4.1 部分获得的溶血液用于总血红蛋白浓度的测定。血红蛋白被存在于溶血试剂中的试剂氧化,通过去污剂分子的配位作用得到特征血红蛋白发色团。20μl 该溶血液与 230μl 缓冲液(R_1—Hb)一起吸移到比色杯中,短暂搅拌并于 37℃保温 5 分钟后,于 660/570nm 处双色检测吸光度。利用校正液 a 和生理盐水溶液(零点标准)建立校正曲线,通过未知样本的吸光度读出浓度。

利用下列公式计算 $HbA1_c$ 的百分含量:

$$\%HbA1_c = \frac{HbA1_c[g/dl]}{Hb[g/dl]} \times 100$$

实施例 5

测定本发明抗体的特异性

为了检测根据实施例 2 得到的抗体的特异性,根据实施例 4

在 Hitachi 717 中进行 $HbA1_c$ 测定。为此，将 HbA_o（根据实施例 3 从人血中纯化得到）、HbS_o（根据实施例 3 纯化的 Sigma H0392）、含 $HbSl_c$（根据实施例 3 在体外制得）的样本以及具有已知 $HbA1_c$ 值（BioRad，Lyphochek^R 糖尿病对照水平 1 和 2，目录号 740）的两个全血对照样作为样本进行检测。结果总结于表 3 中。

表 3

样　　本	$HbA1_c$ ／$HbSl_c$ [g／dl]	Hb [g／dl]	$HbA1_c$ ／$HbSl_c$ [%]
HbA	0	20	0
HbS	0	13.9	0
HbS ＋HbSl (HPLC：11.1%)	1.33	12.3	10.8
Lyphochek 水平 1 (预定值 5.6%)	0.75	14.3	5.2
Lyphochek 水平 2 (预定值 10.4%)	0.98	9.1	10.8

从上述试验中可以看出，本发明抗体可识别 $HbA1_c$ 及 $HbSl_c$，但不识别相应的非糖基化血红蛋白 HbA_o 和 HbS_o。

实施例 6

在混杂的 HbAS 样本中同时测定 $HbA1_c$ 和 $HbSl_c$。

用类似于实施例 4 的方法在 Hitachi 717 中检测混杂的 HbAS 样本（30%HbS）。作出对比，$HbA1_c$ 含量是根据 Bissé E. 和 Wieland H.，J. Chromatogr. 434，1988，95—110（洗脱曲线见图 1）所

述高分辨能力的 HPLC 方法测定的，而糖基化血红蛋白的含量利用亲和层析 Glyc－Affin 测定法（IsoLab Company，目录号 SG 6200）测定。结果总结于表 4 中。

表 4

	$HbA1_c$	$HbS1_c$	$HbA1_c+HbS1_c$
免疫测定	—	—	5.6%
HPLC	3.3%	—	—
Glyc-Affin	—	—	5.4%

根据 Bissé 和 Wieland 用 HPLC 法测得 $HbAl_c$ 值为 3.3%。因为未确知 $HbSl_c$ 峰的洗脱时间，所以不能给出糖基化 HbS（$HbSl_c$）的值。$HbSl_c$ 峰可能是 31—33 分钟洗脱时间时的峰之一。

由于检测了 $HbSl_c$，所以 Tinaquant 试验值比 HPLC 法检测值约高 2.3%。用亲和层析法测得 7.25%的糖基化血红蛋白（检测的糖基化血红蛋白＝$HbAl_c+HbSl_c+HbSl_a+HbSl_b+\varepsilon$—赖氨酸—糖基化血红蛋白）。因为也检测了上述其它种类的糖基化血红蛋白，所以 Glyc—Affin 试验检测值比所描述的免疫试验值高。在用正常样本对 Tinaquant 值和 Glyc—Affin 值进行比较的方法中，获得了具有很好对比度（见图 2）的对比曲线即

$$\%HbA1_c(\text{免疫测定}) = 0.66 \times$$

$$\%\text{ 糖基化血红蛋白(亲和层析)} + 0.6$$

如果利用检测 $HbAl_a$、$HbAl_b$ 等的对比曲线公式校正 Glyc—Affin 值，那么用免疫测定法测定的 $HbAl_c + HbSl_c$ 值几乎相同。