



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1849513 B

(45) 授权公告日 2011.09.21

(21) 申请号 200480026009.4

(56) 对比文件

(22) 申请日 2004.07.09

薛冠华等. 高同型半胱氨酸血症 - 血管疾病的一个独立危险因素. 国外医学外科学分册 29 1. 2002, 29(1), 16-18.

(30) 优先权数据

60/486,865 2003.07.10 US

10/801,623 2004.03.15 US

审查员 钟辉

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.03.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/022218 2004.07.09

(87) PCT申请的公布数据

W02005/008252 EN 2005.01.27

(73) 专利权人 通用原子公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 袁崇生 A·达塔 窦超

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 程金山

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 2 页

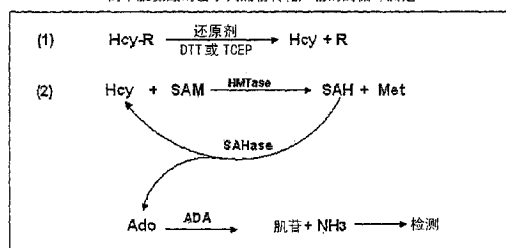
(54) 发明名称

用于测定高半胱氨酸的方法和组合物

(57) 摘要

本发明一般涉及高半胱氨酸检测领域。特别是,本发明提供一种测定样品中高半胱氨酸的存在或浓度的方法,该方法包含:在 Hcy 转化反应中将含有或怀疑含有 Hcy 的样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触以形成 Hcy 转化产物和 Hcy 共底物转化产物;和评估 Hcy 共底物转化产物以确定样品中 Hcy 的存在、不存在和/或数量。本发明还提供了基于相同原理测定高半胱氨酸的试剂盒。

高半胱氨酸的基于共底物转化产物的酶循环测定



Hcy-R: 氧化的高半胱氨酸, R: 蛋白质, Hcy, Cys 或其它硫化化合物;
Hcy: 还原型高半胱氨酸(底物)

SAM: S-腺苷-L-甲硫氨酸(共底物); HMTase: 高半胱氨酸-甲硫氨酸甲基转移酶

SAH: S-腺苷-L-高半胱氨酸(共底物转化产物);

SAHase: S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶; ADA: 腺苷脱氨酶

1. Hcy 共底物、Hcy 转化酶和 SAH 水解酶在制备测定样品中的高半胱氨酸 (Hcy) 的试剂盒中的应用, 其中:

a) 所述 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶是用于在 Hcy 转化反应中与含有或怀疑含有 Hcy 的样品接触以形成 Hcy 转化产物和 Hcy 共底物转化产物, 其中所述 Hcy 共底物是 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM), 所述 Hcy 转化酶是 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶, 所述 Hcy 转化产物是甲硫氨酸 (Met) 并且所述 Hcy 共底物转化产物是 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAH);

b) 所述 SAH 水解酶是用于与以上 (a) 中产生的所述 SAH 接触以产生 Hcy 和腺苷 (Ado), 所述 Hcy 是用于通过 SAM-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶循环至所述 Hcy 转化反应中以形成基于 Hcy 共底物的酶循环反应体系, 所述 Ado 是用于被评估以确定样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量。

2. 权利要求 1 的应用, 其中所述 Ado 被用于与腺苷转化酶而非 SAH 水解酶接触来评估 Ado。

3. 权利要求 2 的应用, 其中通过评估所述腺苷转化酶的腺苷转化的共底物或反应产物来间接进行所述 Ado 的评估。

4. 权利要求 3 的应用, 其中所述腺苷转化酶是腺苷激酶。

5. 权利要求 3 的应用, 其中所述腺苷转化酶是腺苷脱氨酶。

6. 权利要求 1 的应用, 其中所述样品是体液或生物组织。

7. 权利要求 6 的应用, 其中所述体液选自由下列各项组成的组: 尿, 血液, 血浆, 血清, 唾液, 精液, 粪便, 痰液, 脑脊髓液, 泪液, 粘液, 和羊膜液。

8. 权利要求 6 的应用, 其中所述体液是血液。

9. 权利要求 8 的应用, 其中所述血液被进一步分成血浆或血清级分。

10. 权利要求 1 的应用, 其中在所述样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触之前或同时, 样品中氧化的或偶联的 Hcy 被转化为还原型 Hcy。

11. 权利要求 1 的应用, 其中在没有色谱分离的情况下评估所述 Ado。

12. 权利要求 1 的应用, 其中所述 SAM 是用于加入所述样品中。

13. 权利要求 1 的应用, 其中通过 SAM 合酶由 ATP 和 Met 生成所述 SAM。

14. 权利要求 1 的应用, 其中在没有色谱分离的情况下测定样品中的高半胱氨酸。

15. 一种测定样品中的 Hcy 的试剂盒, 该试剂盒包含:

a) S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶;

b) S-腺苷甲硫氨酸 (SAM); 或 ATP, Met 和 SAM 合酶;

c) SAH 水解酶; 和

d) 用于评估腺苷 (Ado) 的试剂。

16. 权利要求 15 的试剂盒, 其中用于评估 Ado 的试剂包含腺苷转化酶而非 SAH 水解酶。

17. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述腺苷转化酶是腺苷激酶或腺苷脱氨酶。

18. 权利要求 15 的试剂盒, 其还包含实施评估样品中高半胱氨酸 (Hcy) 的方法的说明书, 所述方法包括:

a) 在 Hcy 转化反应中将含有或怀疑含有 Hcy 的样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触以形成 Hcy 转化产物和 Hcy 共底物转化产物, 其中所述 Hcy 共底物是 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM),

所述 Hcy 转化酶是 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶,所述 Hcy 转化产物是甲硫氨酸 (Met) 并且所述 Hcy 共底物转化产物是 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAH);

b) 将步骤 (a) 中产生的所述 SAH 与 SAH 水解酶接触以产生 Hcy 和腺苷 (Ado),所述 Hcy 通过 SAM-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶循环至所述 Hcy 转化反应中以形成基于 Hcy 共底物的酶循环反应体系,评估所述 Ado 以确定样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量。

19. 权利要求 15 的试剂盒,其中在容器中包装 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶, S-腺苷甲硫氨酸 (SAM), ATP, Met, SAM 合酶, SAH 水解酶和 / 或评估腺苷 (Ado) 的试剂中的至少一个。

20. 权利要求 19 的试剂盒,其中所述容器是玻璃或塑料容器。

用于测定高半胱氨酸的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在 2003 年 7 月 10 日提交的临时申请 U. S. 顺序号 60/486,865 和在 2004 年 3 月 15 日提交的 U. S. 申请顺序号 10/801,623 的优先权利益,它们的内容通过参考完整地结合于此。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及高半胱氨酸检测领域。特别是,本发明提供一种测定样品中高半胱氨酸 (Hcy) 的存在或浓度的方法,其中在通过 Hcy 转化酶催化的 Hcy 转化反应中将高半胱氨酸与 Hcy 共底物反应以形成 Hcy 转化产物和 Hcy 共底物转化产物,和评估 Hcy 共底物转化产物以确定样品中 Hcy 的存在和 / 或浓度。本发明还提供了基于相同原理测定高半胱氨酸的试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 体液如血浆或血清中的高半胱氨酸的总浓度是疾病的重要标志。例如,高半胱氨酸定量可以是心血管病重要的风险指标,可以是钴胺素和叶酸缺乏的灵敏标志,并且可以用于诊断称为高胱氨酸尿症的代谢的先天缺陷。高半胱氨酸定量也已经报道有效用于评估孕妇中的出生缺陷和老年人的认知损伤。参见 Frantzen, 等, *Enzyme Conversion Immunoassay for Determining Total Homocysteine in Plasma or Serum*, *Clinical Chemistry* 44 :2,311-316 (1998)。

[0006] 高半胱氨酸 (Hcy) 是在 S-腺苷甲硫氨酸 - 依赖性甲基转移反应过程中由甲硫氨酸形成的含硫醇的氨基酸。胞内 Hcy 被再甲基化为甲硫氨酸,或者在一系列反应中不可逆地代谢形成半胱氨酸。胞内 Hcy 被输出到胞外流体如血液和尿中,并且大多以氧化的形式循环,主要与血浆蛋白质结合 (Refsum, 等, *Annu. Rev. Medicine*, 49 :31-62 (1998))。血浆和尿中的 Hcy 的数量反映了 Hcy 生产和利用之间的平衡。该平衡可被各种临床状态所扰乱,所述临床状态其特征在于参与 Hcy 转硫作用和再甲基化的酶 (例如,胱硫醚 β -合酶和 N⁵-亚甲基四氢叶酸还原酶) 的遗传病或参与 Hcy 代谢的维生素类 (例如维生素 B₆, B₁₂ 和叶酸) 的饮食缺乏 (Bauai, 等, *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 64 :543-549 (1997))。另外,血浆 Hcy 水平还可能被一些用于治疗癌症或关节炎的药物如抗叶酸药物 (例如甲氨蝶呤) 所扰乱 (Foody, 等, *Clinician Reviews*, 8 :203-210 (1998))。

[0007] 一些高半胱氨酸血症病例是由编码参与 Hcy 代谢的酶的基因的纯合缺陷所导致。在这些病例中,参与 Hcy 再甲基化或转硫作用的酶的缺陷导致血液和尿中 Hcy 高达 50 倍的升高。这种病症的典型形式,先天性高半胱氨酸血症 (Hcyemia),是由编码胱硫醚 β -合酶 (CBS) 的基因的纯合缺陷所导致。这些个体在早年患有血栓栓塞并发症,其导致中风,心肌梗死,肾血管性高血压,间歇性跛行,肠系膜局部缺血,和肺栓塞。这些患者还可能显示智力迟钝和其它类似于晶状体异位和骨骼畸形的异常 (Perry T., *Homocysteine :Selected aspects in Nyham W.L. ed. Heritable disorders of amino acid metabolism*. New York, John Wiley & Sons, pp. 419-451 (1974))。还已知孕妇中升高的 Hcy 水平与具有神经管闭合的

儿童出生缺陷有关 (Scott, 等, " The etiology of neural tube defects" in Graham, I., Refsum, H., Rosenberg, I.H., and Ureland P.M. ed. " Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine" Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 133-136 (1995)). 因此, Hcy 测定的诊断应用已经在这些临床病症中很好地证明。

[0008] 已经显示即使是轻微或适度升高的 Hcy 水平也增加了冠状动脉、脑动脉和外周动脉的动脉粥样硬化和心血管病的风险 (Boushey, 等, JAMA, 274:1049-1057 (1995)). 在患有脑血管病、外周血管病和心血管病的患者中, 高半胱氨酸血症的发病率据显示分别为 42%, 28%, 和 30% (Moghadasian, 等, Arch. Intern. Med., 157:2299-2307 (1997)). 27 项临床研究的 meta- 分析计算表明, Hcy 水平每增加 $5 \mu\text{M}$, 男人和女人的冠状动脉病的风险分别增加 60% 和 80%, 其相当于血浆胆固醇增加 $20\text{mg}/\text{dl}^{-1}$ ($0.5\text{mmol}/\text{dl}^{-1}$), 提示 Hcy 作为风险因子在一般人群中与胆固醇一样强大。这些临床研究的结果得出结论, 即高半胱氨酸过高血症是心血管疾病的一个新出现的独立的风险因子, 并且可以解释所有不具有任何确立的心血管风险因子 (例如高血压, 高胆固醇血症, 吸烟, 糖尿病, 显著肥胖和身体不活动) 的心血管患者中的一半。

[0009] 轻度高半胱氨酸血症主要是由酶缺陷的杂合性造成的。亚甲基四氢叶酸还原酶的基因的一种常见多态性似乎影响高半胱氨酸水平对叶酸缺乏的敏感性 (Boers, 等, J. Inher. Metab. Dis., 20:301-306 (1997)). 此外, 血浆高半胱氨酸水平还在以下患者中显著升高: 心脏和肾脏移植患者 (Ueland, 等, J. Lab. Clin. Med., 114:473-501 (1989)), 阿尔茨海默氏病患者 (Jacobsen, 等, Clin. Chem., 44:2238-2239 (1998)), 以及非胰岛素依赖型糖尿病患者 (Ducloux, 等, Nephrol. Dial. Transplant, 13:2890-2893 (1998)). 将升高的高半胱氨酸与心血管病联系在一起的证据的积累已经促使开始双盲、随机和安慰剂对照的多中心临床试验以证明降低血浆 Hcy 在预防或阻止血管病的进展中的功效 (Diaz-Arrastia, 等, Arch. Neurol., 55:1407-1408 (1998)). 血浆高半胱氨酸水平的测定应当是一项常规的临床实践。

[0010] 作为心血管病的风险因子, 已经在临床设置中推荐测定总血浆 Hcy 水平 (还原型, 氧化型和结合蛋白的) (Homburger, 等, American J. of Public Health, 88:61-67 (1998)). 自从 1982 年, 已经描述了几种测定总血浆 Hcy 的方法 (Mansoor, 等, Anal. BioChem., 200:218-229 (1992); Steir, 等, Arch. Intern. Med., 158:1301-1306 (1998); Ueland, 等, Clin. Chem., 39:1764-1779 (1993); 和 Ueland, 等, " Plasma homocysteine and cardiovascular disease" in Francis, R. B. Jr. eds. Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis, and Endothelial Function. New York, Marcel Dekker, pp. 183-236 (1992); 还参见 Ueland, 等, " Plasma homocysteine and cardiovascular disease" in Francis, R. B. Jr. eds. Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis, and Endothelial Function. New York, Marcel Dekker, pp. 183-236 (1992)). 血浆或血清中总 Hcy 的测定由于 70% 的血浆 Hcy 是蛋白结合的和 20-30% 作为游离的对称或大多不对称的混合二硫化物而存在的事实而变得复杂。游离的还原型 Hcy 仅痕量存在 (Stehouwer, 等, Kidney International, 55:308-314 (1999)).

[0011] 大多数方法需要复杂的色谱技术如 HPLC, 毛细管气相色谱法, 或质谱分析 (GC/MS) 以直接或间接 (例如通过 SAH 水解酶将 Hcy 酶促转化为 SAH(S-腺苷高半胱氨酸), 接

着 HPLC 或 TLC 分离) 测量 Hcy。也已经使用在 TLC 分离前通过 SAH 水解酶将 Hcy 放射酶促转化为放射性标记 SAH。在这些测定中, 色谱分离是这些方法中共同的关键步骤, 而色谱分离通常是耗时并且实行起来繁重。更具体地, 这些方法要求高度专业化和复杂的仪器和训练有素的分析专家。这些仪器的使用通常没在常规临床实验室实践中广泛接受。

[0012] 还已知针对 Hcy 的免疫测定, 其使用针对 SAH 的单克隆抗体 (Araki, 等, *J. Chromatog.*, 422:43-52 (1987))。这些测定是基于 Hcy 向 SAH 的转化, 然后通过单克隆抗体检测 SAH。已经开发了针对清蛋白结合的 Hcy 的单克隆抗体以用于测定清蛋白结合的 Hcy (Stabler, 等, *J. Clin. Invest.*, 81:466-474 (1988)), 清蛋白结合的 Hcy 是总血浆 Hcy 的主要级分。还可以获得其它免疫学工具 (参见例如 U. S. 专利号 . 5, 631, 127, 5, 827, 645, 5, 958, 717, 6, 063, 581 和 5, 885, 767)。尽管免疫测定避免了耗时的色谱分离步骤并且适合自动化, 但是单克隆抗体的生产是昂贵的和有点无法预测的, 并且通常需要第二或甚至第三抗体来检测。最近, 已经报道了高半胱氨酸测定的酶促方法 (Matsuyama, 等, *Clinical Chemistry*, 47:2155-2156 (2001); Tan 等, *Clinical Chemistry*, 49:1029-1030 (2003); U. S. 专利号 5, 885, 767, 5, 998, 191, 6, 046, 017, 6, 174, 696, 6, 436, 658 和 6, 664, 073B1), 所有这些描述的高半胱氨酸测定基于通过高半胱氨酸转化酶生成的高半胱氨酸转化产物的评估。

[0013] 在美国专利号 6, 686, 172 和美国专利申请公开号 2002/0119507 中描述了用于检测样品中的高半胱氨酸的其它方法。

[0014] 需要一种有效而准确的测定方法, 其能够在不需要高度熟练的技术人员或复杂分析化学仪器的情况下实行。本发明解决了本领域中的上述和其它相关问题。

[0015] 发明概述

[0016] 一方面, 本发明涉及一种关于样品中高半胱氨酸的测定方法。按照该测定方法, 在 Hcy 转化反应中将含有或怀疑含有高半胱氨酸 (Hcy) 的样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触以形成 Hcy 转化产物和 Hcy 共底物转化产物; 和评估 Hcy 共底物转化产物以确定所述样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量。

[0017] 在本发明的一些实施方案中, 在没有色谱分离的情况下评估 Hcy 共底物转化产物。

[0018] 在一些实施方案中, Hcy 共底物是 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM), Hcy 转化酶是 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶, 所述 Hcy 转化产物是甲硫氨酸 (Met) 并且所述 Hcy 共底物转化产物是 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAH), 评估 SAH 以确定所述样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量。

[0019] 可以以任何适当形式使用 SAM。例如, 将 SAM 直接加入样品。在另一实施例中, 通过另外的反应生产 SAM, 例如通过 SAM 合酶由 ATP 和 Met 生产 SAM。

[0020] SAH 可以转化为 Hcy 和腺苷 (Ado), 评估 Ado 以确定所述样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量。在一些实施方案中, SAH 与 SAH 水解酶接触以由 SAM 生成 Hcy 和腺苷 (Ado), 所述 Hcy 通过 SAM-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶循环至所述 Hcy 转化反应中以形成基于 Hcy 共底物的酶循环反应体系, 评估所述 Ado 以确定样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量。

[0021] 可以通过本领域已知的任何适当方法如免疫学方法或酶促方法来评估 Ado。可以

直接或间接评估 Ado。例如,可以通过腺苷转化酶评估腺苷转化的共底物或反应产物来间接评估 Ado。在一些实施方案中,腺苷转化酶是腺苷激酶,反应产物是腺苷 5' - 一磷酸。在其它实施方案中,腺苷转化酶是腺苷脱氨酶并且反应产物是铵和肌苷。

[0022] 在一方面,本发明涉及一种测定样品中的高半胱氨酸 (Hcy) 的方法,该方法包含:

[0023] a) 在 Hcy 转化反应中将含有或怀疑含有 Hcy 的样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触以形成 Hcy 转化产物和 Hcy 共底物转化产物,其中所述 Hcy 共底物是 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM),所述 Hcy 转化酶是 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM)- 依赖性高半胱氨酸 S- 甲基转移酶,所述 Hcy 转化产物是甲硫氨酸 (Met) 并且所述 Hcy 共底物转化产物是 S- 腺苷 -L- 高半胱氨酸 (SAH),和

[0024] b) 评估所述 SAH 以确定样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量,其中在没有色谱分离的情况下评估所述 SAH。

[0025] 可以以任何适当形式使用 SAM。例如,将 SAM 直接加入样品。在另一实施例中,通过另外的反应生产 SAM,例如通过 SAM 合酶由 ATP 和 Met 生产 SAM。

[0026] 可以通过本领域已知的任何适当方法如免疫学方法或酶促方法来评估 SAH。例如,可以通过评估 SAH 和突变型 SAH 结合酶之间的结合来评估 SAH,所述突变型 SAH 结合酶如对 Hcy、SAH 或腺苷具有结合亲和力但具有减弱的催化活性的突变型 SAH 水解酶。在一个实施例中,SAH 的评估不包括生成 H₂O₂ 的酶促反应和 H₂O₂ 的检测。

[0027] 在另一个实施例中,可以通过使用与 SAH 特异性结合的抗体来评估 SAH。抗体可以是单克隆的或多克隆的。抗体还可以与载体基质结合。可以使用任何适当的免疫测定形式,例如夹层和竞争性测定形式。

[0028] 本发明的方法可以用于测定任何样品中的高半胱氨酸,所述样品包括但不限于体液或生物组织。所述体液可以选自由下列各项组成的组:尿,血液,血浆,血清,唾液,精液,粪便,痰液,脑脊髓液,泪液,粘液,和羊膜液。在一些实施方案中,所述体液是血液。在一些实施方案中,所述血液样品被进一步分成血浆或血清级分。

[0029] 在一些实施方案中,在所述样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触之前或同时,将样品中氧化的或偶联的 Hcy 转化为还原型 Hcy。在一些实施方案中,将样品进行适当量的二硫苏糖醇、三 (2- 羧乙基)- 膦盐酸盐 (TCEP) 或其它还原剂的处理,以在样品中生成游离的高半胱氨酸。

[0030] 本发明的方法可以另外包含以下步骤:去除在将样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触之前或同时用于将氧化的或偶联的 Hcy 转化为还原型 Hcy 的还原剂。例如,通过加入 N- 乙基马来酰亚胺或其它硫 (thio)- 反应化合物可以去除还原剂。

[0031] 本发明还有另一方面涉及用于确定样品中高半胱氨酸的存在或浓度的试剂盒,该试剂盒包含:a)Hcy 转化酶;b)Hcy 共底物;和 c) 用于评估 Hcy 共底物转化产物的试剂。

[0032] 在一些实施方案中,所述 Hcy 共底物是 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM),所述 Hcy 转化酶是 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM)- 依赖性高半胱氨酸 S- 甲基转移酶,所述 Hcy 共底物转化产物是 S- 腺苷 -L- 高半胱氨酸 (SAH),并且用于评估 Hcy 共底物转化产物的试剂是用于评估 SAH 的试剂。在一些实施方案中,试剂盒另外包含一种试剂,例如 SAH 水解酶,以由 SAM 生成 Hcy 和腺苷 (Ado),所述 Hcy 通过 SAM- 依赖性高半胱氨酸 S- 甲基转移酶循环至所述 Hcy 转化反应中以形成基于 Hcy 共底物的酶循环反应体系。

[0033] 本发明还提供一种测定样品中 Hcy 的试剂盒,该试剂盒包含:a)S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶;b)S-腺苷甲硫氨酸(SAM)或 ATP, Met 和 SAM 合酶;c)SAH 水解酶;和 d)用于评估腺苷(Ado)的试剂。用于评估 Ado 的试剂可以是不同于 SAH 水解酶的腺苷转化酶,如腺苷激酶和腺苷脱氨酶。

[0034] 本发明还提供了一种测定样品中 Hcy 的试剂盒,该试剂盒包含:a)

[0035] S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶;b)S-腺苷甲硫氨酸(SAM)或 ATP, Met 和 SAM 合酶;和 c)用于评估 SAH 的试剂,其中所述试剂盒不包含用于生成 H₂O₂ 的酶或试剂和用于检测 H₂O₂ 的试剂。

[0036] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒另外包含还原剂如二硫苏糖醇(DTT)或 TCEP。

[0037] 本发明的试剂盒可以是任何适当的包装并且还可以包括实施本文所述方法的使用说明。试剂盒可以任选地包括另外的组分如缓冲剂。

[0038] 本文所述的测定可以用于任何适当的目的,例如预后,诊断,药物筛选或治疗监视目的。测定可以容易地自动化。另外,测定可以适用于护理系统点(point of care system)和家庭检测试剂盒。例如,可以调整护理系统的血液检测点以使用本文提供的方法测量高半胱氨酸水平。家庭检测试剂盒还可以适用于与本文提供的方法使用。

[0039] 附图简述

[0040] 图 1 举例说明了例举性的高半胱氨酸的测定方法。Hcy:L-高半胱氨酸;SAM:S-腺苷甲硫氨酸;HMTase:SAM-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶;和 SAHase:S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶。

[0041] 图 2 描绘了在实施例 1 中所述的实验中获得的血清高半胱氨酸剂量反应曲线。

[0042] 图 3 描绘了例举性的 Diazyme 高半胱氨酸酶促测定与在 Cobas Mira 分析仪上进行的 Catch 高半胱氨酸测定之间的比较。

[0043] 图 4 描绘了例举性的 Diazyme 高半胱氨酸酶促测定与在 BeckmanSynchron CX-7 分析仪上进行的 Catch 高半胱氨酸测定之间的比较。

[0044] 发明详述

[0045] 为了公开内容清楚且并非为了限制,将本发明的详细描述分成以下几个分部。

[0046] A. 定义

[0047] 除非另外定义,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文所引的所有专利、申请、公开的申请和其它出版物通过参考完整地结合于此。如果本部分阐明的定义与通过参考结合于此的所述专利、申请、公开的申请和其它出版物中阐明的定义相反或否则不一致,本部分阐明的定义优先于通过参考结合于此的定义。

[0048] 如本文所用,“一种(a)”或“一种(an)”是指“至少一个”或“一个或多个”。

[0049] 如本文所用,“高半胱氨酸(Hcy)”是指具有下列分子式的化合物:HSCH₂CH₂CH(NH₂)COOH。在生物学上,Hcy 是通过将甲硫氨酸脱甲基化生成的并且是由甲硫氨酸生物合成半胱氨酸中的中间体。术语“Hcy”包含游离的 Hcy(还原型)和偶联的 Hcy(氧化型)。Hcy 可以与蛋白质、肽、其本身或其它硫醇类通过二硫键偶联。

[0050] 如本文所用,“高半胱氨酸(Hcy)转化反应”是指其中化合物与 Hcy 分子反应的反

应,期间化学基团(例如甲基)从化合物转移到 Hcy 分子上而形成反应产物。与 Hcy 分子反应且提供化学基团的化合物被称为“高半胱氨酸(Hcy)共底物”。催化反应的酶被称为“高半胱氨酸(Hcy)转化酶”。含有整个或部分原始 Hcy 分子的反应产物被称为“高半胱氨酸(Hcy)转化产物”。不含有来自于原始 Hcy 分子的任何元件的反应产物被称为“Hcy 共底物转化产物”。

[0051] 如本文所用,“SAM-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶”是指催化由高半胱氨酸和 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)形成甲硫氨酸和 S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)的酶。意欲包含具有保守的氨基酸替代的 SAM-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶,所述保守的氨基酸替代不实质上改变其活性。

[0052] 如本文所用,“SAH 水解酶”是指遍在的真核生物酶,其也在一些原核生物中发现,催化 SAH 向腺苷(Ado)和 Hcy 的水解。SAH 水解酶还催化由 Ado 和 Hcy 形成 SAH。SAH 水解酶的辅酶是 NAD^+/NADH 。SAH 水解酶可以具有几种催化活性。在水解方向上,第一步包括通过酶结合的 $\text{NAD}^+(\text{E-NAD}^+)$ 将 SAH 的 3'-羟基基团氧化(3'-氧化活性),接着通过 L-Hcy 的 β -消除以提供 3'-酮基-4',5'-二脱氢-5'-脱氧-Ado。向该紧密结合的中间体的 5'-位的水的 Michael 加成(5'-水解活性)提供了 3'-酮基-Ado,其然后通过酶结合的 $\text{NADH}(\text{E-NADH})$ 还原成 Ado(3'-还原活性)。意欲包含具有保守氨基酸替代的 SAH 水解酶,所述保守的氨基酸替代不实质上改变其活性。

[0053] 如本文所用,术语“评估”意欲包括在获得样品中存在的分析物(例如高半胱氨酸或 Ado)的量或浓度的绝对值和另外在获得指示样品中分析物水平的指标、比率、百分比、直观的或其它值的意义上的定量和定性测定。评估可以是直接或间接的并且实际检测的化学物质当然不需要是分析物本身,而可以例如是其衍生物或一些另外的物质。

[0054] 如本文所用,“腺苷脱氨酶”是指催化腺苷脱氨基形成肌苷的酶。意欲包括具有保守氨基酸替代的腺苷脱氨酶,所述保守的氨基酸替代不实质上改变其活性。

[0055] 如本文所用,“腺苷激酶”是指催化由腺苷和 ATP 形成腺苷 5'-一磷酸和 ADP 的酶。意欲包括具有保守氨基酸替代的腺苷激酶,所述保守的氨基酸替代不实质上改变其活性。

[0056] 如本文所用,“血清”是指在去除血纤蛋白凝块和血细胞以后获得的血液的流体部分,其区别于循环血中的血浆。

[0057] 如本文所用,“血浆”是指血液的流体、非细胞部分,其区别于在凝固后获得的血清。

[0058] 如本文所用,“通过重组方法生产”是指使用重组核酸方法的生产方法,该方法依赖于公知的分子生物学方法以表达由克隆的核酸编码的蛋白质。

[0059] 如本文所用,“流体”是指可以流动的任何组合物。流体因此包含半固体、膏状物、溶液、水性混合物、凝胶、洗液、乳膏形式的组合物和其它这些组合物。

[0060] 如本文所用,“样品”是指可以含有分析物的任何事物,期望针对该分析物进行分析测定。样品可以是生物样品,如生物流体或生物组织。生物流体的实例包括尿,血液,血浆,血清,唾液,精液,粪便,痰液,脑脊髓液,泪液,粘液,羊膜液等。生物组织是细胞的聚集体,通常是特定种类的细胞和它们的胞间物质一起,形成人、动物、植物、细菌、真菌或病毒结构的一种结构物质,包括结缔组织,上皮组织,肌肉组织和神经组织。生物组织的实例还包括器官,肿瘤,淋巴结,动脉和单个细胞。

[0061] 如本文所用,“疾病或病症”是指生物体中由例如感染或遗传缺陷所导致的病理状况,其特征在于可识别的症状。

[0062] 如本文所用,“抗体”不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv),单链(ScFv), diabody,由抗体片段形成的多特异性抗体,其突变体,包含抗体部分的融合蛋白,和包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的其它任何改进构型。抗体包括任何种类的抗体,如 IgG, IgA,或 IgM(或其亚类),抗体不需要是任何具体类别。

[0063] B. 测定高半胱氨酸的方法

[0064] 本发明提供测定样品中的高半胱氨酸(Hcy)的方法,该方法包含:

[0065] a) 在Hcy转化反应中将含有或怀疑含有Hcy的样品与Hcy共底物和Hcy转化酶接触以形成Hcy转化产物和Hcy共底物转化产物;和b) 评估所述Hcy共底物转化产物以确定所述样品中所述Hcy的存在、不存在和/或数量。

[0066] 在一些实施方案中,在没有色谱分离的情况下评估Hcy共底物转化产物。

[0067] 在一些实施方案中,Hcy转化酶是S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性高半胱氨酸S-甲基转移酶。当将SAM-依赖性高半胱氨酸S-甲基转移酶用作Hcy转化酶时,Hcy共底物是S-腺苷甲硫氨酸(SAM),Hcy转化产物是甲硫氨酸(Met),Hcy共底物转化产物是S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH),且评估SAH以确定所述样品中Hcy的存在、不存在和/或数量。

[0068] 可以使用将甲基基团从SAM转移至Hcy的任何S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性高半胱氨酸S-甲基转移酶。例如,可以使用Shapiro和StanleyK(Methods Enzymol. 17Pt. B, Sulfur Amino acids, pp. 400-405(1971))和Shapiro SK(Biochim. Biophys. Acta. 29: 405-9(1958))所述的S-腺苷甲硫氨酸:L-高半胱氨酸S-甲基转移酶。还可以使用由具有下列GenBank登记号AF297394的核酸编码的高半胱氨酸S-甲基转移酶(EC 2.1.1.10)和具有下列GenBank登记号的氨基酸序列:AAG10301, CAA16035, NP_856132, NP_302039, CAD97346, T51939, T51941和CAC30428。优选地,可以使用来源于大肠杆菌的SAM-依赖性高半胱氨酸S-甲基转移酶(Thanbichler等, J. Bacteriol., 181(2):662-5(1999))或来源于酵母菌的SAM-依赖性高半胱氨酸S-甲基转移酶(Shapiro等, J. Biol. Chem., 239(5)1551-6(1964)和Thomas等, J Biol. Chem., 275(52):40718-24(2000))。

[0069] 可以以任何适当形式使用SAM。例如,将SAM直接加入样品。在另一实施例中,通过另外的反应生产SAM,例如通过SAM合酶由ATP和Met生产SAM。

[0070] 可以使用本领域已知的任何方法评估SAH。例如,可以使用与SAH特异性结合的抗体来评估SAH。抗体可以是单克隆的或多克隆的。与SAH特异结合的抗体的实例在美国专利号5,631,127和6,063,581中描述。使用本领域已知的方法也可以生产对SAH特异性的抗体,所述方法例如在美国专利5,631,127和6,063,581中描述的方法。

[0071] 使用SAH特异性的抗体,可以将任何免疫学测定用于检测SAH,例如在溶液中或在固体载体上的竞争性或夹层测定,沉淀/聚集测定。在一些实施方案中,通过将SAM-依赖性高半胱氨酸S-甲基转移酶反应的样品在SAM的存在下,与SAH特异性抗体和与不同于SAH的抗体的可检测的半抗原接触来评估SAH,其中测定SAH的存在或数量是通过确定或者与所述抗体结合或者未与所述抗体结合的所述可检测的半抗原的存在或数量来间接进行的。在一些实施方案中,所述抗体与载体基质结合。

[0072] 还可以使用突变型 SAH 水解酶评估 SAH, 该突变型 SAH 水解酶具有对 SAH 的结合亲和力但是具有减弱的催化活性。这些突变型 SAH 水解酶和使用突变型 SAH 水解酶的测定方法在美国专利号 6, 376, 210 和 W003/060478 中描述。

[0073] SAH 还可以如下评估: 通过 SAH 水解酶将 SAH 转化为腺苷和 Hcy, 并且评估生成的腺苷。在一些实施方案中, SAH 与 SAH 水解酶接触以由 SAM 生成 Hcy 和腺苷 (Ado), 所述 Hcy 通过 SAM- 依赖性高半胱氨酸 S- 甲基转移酶循环至所述 Hcy 转化反应中以形成基于 Hcy 共底物的酶循环反应体系, 评估所述 Ado 以确定样品中 Hcy 的存在、不存在和 / 或数量。

[0074] 在一些实施方案中, 本发明提供一种用于测定样品中的高半胱氨酸的方法, 该方法包含: a) 如果存在于样品中, 使用甲基供体 (例如 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM)) 和 SAM- 依赖性高半胱氨酸 S- 甲基转移酶将高半胱氨酸甲基化, 以形成甲硫氨酸和 S- 腺苷 -L- 高半胱氨酸 (SAH); b) 从所述形成的 SAH 中释放腺苷 (Ado) 并使用酶 S- 腺苷 -L- 高半胱氨酸水解酶生成高半胱氨酸; 和 c) 评估所述释放的 Ado 以确定所述样品中高半胱氨酸的存在和 / 或数量。该方法可以另外包括测量 Ado 随时间的释放量。优选地, 循环步骤 a) 和 b) 以释放所述 Ado, 其释放速率可以与样品中的高半胱氨酸的浓度相关联。还优选地, Ado 的释放速率与标准的高半胱氨酸的浓度值相关联。可以使用任何适当的甲基供体和甲基转移酶。例如, 甲基供体可以是 SAM 并且甲基酶可以是 SAM- 依赖性高半胱氨酸甲基转移酶。优选地, 所述甲基供体 SAM 是以至少约 5 μ M 的浓度提供。Ado 形成的速率可以使用任何适当的方法测量。例如, Ado 形成的速率可以用酶法测量。优选地, Ado 形成的速率是使用以下酶测量的: Ado 脱氨酶, 谷氨酸脱氢酶, 嘌呤核苷磷酸化酶, 黄嘌呤氧化酶, 过氧化物酶, 腺苷激酶, 或这些酶的任何两项或多项的组合。这些测定方法在本文中进一步描述。

[0075] 可以以任何适当形式使用 SAM。例如, 将 SAM 直接加入样品。在另一实施例中, 通过另外的反应生产 SAM, 例如通过 SAM 合酶由 ATP 和 Met 生产 SAM。

[0076] 可以使用任何 SAH 水解酶。例如, 可以使用含有 GenBank 登记号为 M61831-61832 的核苷酸序列的核酸分子以获得编码 SAH 水解酶的核酸 (参见 Coulter-Karis 和 Hershfield, *Ann. Hum. Genet.*, 53(2):169-175(1989))。还优选地, 含有核苷酸序列或编码在美国专利号 5, 854, 023 中描述的氨基酸的核酸分子可以用于获得 SAH 水解酶。

[0077] 可以使用各种还原剂 (例如 DTT, TCEP, 半胱氨酸, 巯基乙醇, 二硫赤藓糖醇, 硼氢化钠等), 然而 DTT 是特别适当的, 例如浓度为约 5mM。DTT 本身应当贮存在低 pH 下, 因此测定试剂盒可以便利地包括低 pH (例如约 3)、但是具有低缓冲能力的 DTT 溶液和分开的 SAH- 水解酶溶液, 其在基本上中性 pH 下可以部分或完全无活性并且优选是缓冲过的。当这些溶液合并时, 酶在中性 pH 下被再活化。如果需要该合并可以在试验样品的存在下进行, 或者试验样品在其后不久加入。以上提及的其它还原剂可以类似地用于 SAH- 水解酶的稳定化 / 活化。TCEP 可以贮存在中性 pH 下, 这允许酶与还原剂包括在相同试剂中。

[0078] Ado 可以通过本领域已知的任何适当方法评估, 所述方法如免疫学方法或酶促方法。可以使用通常依赖于光度计 (例如比色、分光光度计或荧光) 检测的方法和免疫学方法, 因为这些可以特别容易地适用于临床实验室使用。还可以使用基于酶促反应或与单-或多-克隆抗体的反应的方法, 因为这些方法简单和快速并且实行起来相对便宜。例如, 通过监视与酶的反应可以评估 Ado, 该酶将其直接或间接转化为可以用光度计 (例如分光光度计法) 检测的产物。适当的酶当然应当不与高半胱氨酸转化酶的其他底物 (特别是

高半胱氨酸)反应,该适当的酶包括腺苷脱氨酶(其将腺苷转化为肌苷)和腺苷激酶(其将腺苷和 ATP 转化为 ADP 和磷酸化腺苷)。这些酶可以另外与用于将形成的产物转化为另外的可检测的产物的其它酶组合。

[0079] 因此,用于本发明测定的例举性的 Ado 检测方案包括:

[0080] 腺苷 → FPIA 检测 + 荧光标记的腺苷 (1)

[0081] 腺苷 → 肌苷 + NH₃ (2)

[0082] α-酮戊二酸 + NH₃ + NAD(P)H → L-谷氨酸 + NAD(P)⁺ (2a)

[0083] 肌苷 → 次黄嘌呤 (2b1)

[0084] 次黄嘌呤 + O₂ → 黄嘌呤 + H₂O₂ (2b2)

[0085] 黄嘌呤 + O₂ → 尿酸 + H₂O₂ (2b3)

[0086] 2H₂O₂ + 4-AA(氨基安替比林) + TOOS(N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-间-甲苯胺) → 醌染料 + 4H₂O (2b4)

[0087] 腺苷 + ATP → 腺苷-5' -P + ADP (3)

[0088] 磷酸烯醇丙酮酸 + ADP + H⁺ → 丙酮酸 + ATP (3a)

[0089] 丙酮酸 + NADH → 乳酸 + NAD⁺ (3b)

[0090] 在方案(1)中,进行免疫测定,可以检测荧光标记的腺苷。

[0091] 在方案(2)中,通过腺苷脱氨酶催化反应,腺苷脱氨酶反应生成的氨可以容易地使用已知方法例如比色技术检测。因此,例如在样品中生成的氨可以反应形成有色产物,其形成可以通过分光光度计法检测。

[0092] 在方案(2a)中,通过L-谷氨酸脱氢酶催化反应,可以在340nm下用分光光度计法检测NAD(P)⁺。

[0093] 在方案(2b1)中,通过嘌呤核苷磷酸化酶催化。在方案(2b2)和(2b3)中,通过黄嘌呤氧化酶催化反应。在方案(2b4)中,通过过氧化物酶催化反应。肌苷和尿酸具有不同的UV吸收性质,因此可以用分光光度计法通过动态测量监视。然而,尿酸或肌苷的UV检测的使用具有某些限制,因为该方法的灵敏性是相当差的并且其需要UV-光源和UV-透明的样品容器。因此可以更便利地依赖于550nm处的醌染料的比色检测。

[0094] 备选地,在方案(2b)中;黄嘌呤氧化酶反应使得其本身使用荧光团或生色团例如氧化还原指示剂检测,该检测通过评估还原/氧化电势或通过测量O₂消耗,或者更具体地测量H₂O₂形成,例如通过使用电子传感器进行。许多氧化-还原指示剂可以用于该目的,在文献中描述了各种各样的方法用于测定溶液中的H₂O₂和O₂。实际上,在临床测定中经常检测H₂O₂。例如过氧化氢也可以使用peroxioxalate和吡啶鎓酯的非酶促化学发光反应来评估,后者在中性pH下在水溶液中。

[0095] 在方案(3)中,通过腺苷激酶催化反应。在方案(3a)中,通过丙酮酸激酶催化反应。在方案(3b)中,通过乳酸脱氢酶催化反应。在方案(3b)中生成的NAD(P)⁺可以通过分光光度计法在340nm下检测。

[0096] 任何腺苷脱氨酶可以用于方案(2)。例如,可以使用来源于牛脾的腺苷脱氨酶(Sigma-Aldrich目录号A5168,6648和5043),来源于小牛肠粘膜的腺苷脱氨酶(Sigma-Aldrich目录号01898,A9876和A1030)或来源于人红细胞的人腺苷脱氨酶(Sigma-Aldrich目录号BCR647)。在另一实施例中,可以使用由核酸编码的腺苷脱氨

酶,该核酸的 GenBank 登记号是 U76422(人类,还参见 Lai,等, Mol. Cell. Biol., 17(5): 2413-24(1997))。

[0097] 可以将任何嘌呤核苷磷酸化酶用于方案 (2b)。例如,可以使用由具有下列 GenBank 登记号的核酸编码的嘌呤核苷磷酸化酶:U88529(大肠杆菌);U24438(大肠杆菌,还参见 Comell 和 Riscoe, Biochim. Biophys. Acta, 1396(1):8-14(1998));U83703(H. pylori);和 M30469(大肠杆菌)。

[0098] 可以将任何黄嘌呤氧化酶用于方案 (2b)。例如,可以使用由具有下列 GenBank 登记号的核酸编码的黄嘌呤氧化酶:AF080548(苜蓿根瘤菌 (Sinorhizobium meliloti));和 U39487(人类,还参见 Saksela 和 Raivio, Biochem. J., 315(1):235-9(1996))。

[0099] 可以将任何腺苷激酶用于方案 (3)。例如,可以使用由具有下列 GenBank 登记号的核酸编码的腺苷激酶:NM_006721(Homo sapiens);NM_001532(Homo sapiens);NM_001123(Homo sapiens);NM_021129(Homo sapiens);和 BC003568(Homo sapiens)。还可以使用在美国专利号 5,861,294, McNally 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 231:645-650(1997),和 Singh 等, Eur. J. Biochem. 241:564-571(1996) 中公开的腺苷激酶。

[0100] 可以将任何谷氨酸脱氢酶用于方案 (2a)。例如,可以使用在 Perez-de laMora 等, Anal. Biochem., 180(2):248-52(1989) 和 Gore, Int. J. Biochem., 13(8):879-86(1981) 中公开的谷氨酸 (glutamate) 脱氢酶 (或谷氨酸 (glutamic acid) 脱氢酶)。

[0101] 可以将任何丙酮酸激酶用于方案 (3a)。例如,可以使用来源于猪的丙酮酸激酶 (Sigma-Aldrich 目录号 K4388), 来源于嗜热脂肪芽孢杆菌 (Bacillus stearothermophilus) (Sigma-Aldrich 目录号 P1903), 来源于鸡肌肉的丙酮酸激酶 (Sigma-Aldrich 目录号 P5788) 和来源于兔肌肉的丙酮酸激酶 (Sigma-Aldrich 目录号 83330)。

[0102] 可以将任何乳酸脱氢酶用于方案 (3b)。例如,可以使用来源于人的乳酸脱氢酶 (Sigma-Aldrich 目录号 BCR404), 来源于德氏乳杆菌乳亚种 (Lactobacillus leichmanii) 的乳酸脱氢酶 (Sigma-Aldrich 目录号 61306), 来源于乳酸杆菌属 (Lactobacillus sp) 的乳酸脱氢酶 (Sigma-Aldrich 目录号 59023) 和来源于兔肌肉的乳酸脱氢酶 (Sigma-Aldrich 目录号 61311)。

[0103] 本文所述的方法可以用于评估任何样品,例如体液或生物组织。例举性的体液包括尿,血液,血浆,血清,唾液,精液,粪便,痰液,脑脊髓液,泪液,粘液,和羊膜液。优选地,测定的体液是血液。血样可以直接测定或者在测定前处理。例如,血样可以进一步分成血浆或血清级分。

[0104] 在所述样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触之前或同时,将样品中氧化的或偶联的 Hcy 转化为还原型 Hcy。在血浆或尿中,显著部分的存在的高半胱氨酸可能通过二硫键与循环蛋白如清蛋白结合,高半胱氨酸还可以以其它二硫化物衍生物的形式存在 (通常为高半胱氨酸-半胱氨酸偶联物)。为了获得对样品中存在的总高半胱氨酸的评估,因此可以理想的用还原剂处理样品以裂解二硫键和释放游离的高半胱氨酸。

[0105] 可以使用任何适当的还原剂。二硫化物容易和特别地被硫醇类还原 (例如三-正丁基膦 (TBP),二硫苏糖醇 (DTT),二硫赤藓糖醇 (DTE),2-巯基-乙醇,半胱氨酸-巯基乙酸盐 (酯),巯基乙酸,三 (2-羧乙基) 膦,游离金属,谷胱甘肽和类似的化合物)。可以使用

氢硼化物(例如氢硼化钠)或汞齐(例如钠汞齐),或者可以使用更专用的试剂如膦或硫代磷酸酯实现直接化学还原。二硫化物还原在 Methods of Enzymology 143:243-256(1987)中由 Jocelyn 综述,其中列举了各种各样的适当的还原剂。还原剂还可以是三(2-羧乙基)-膦盐酸盐(TCEP)。优选地,以高达约 30mM 的浓度提供二硫苏糖醇或 TCEP。

[0106] 本发明的方法可以另外包含去除在将样品与 Hcy 共底物和 Hcy 转化酶接触之前或同时用于将氧化的或偶联的 Hcy 转化为还原型 Hcy 的还原剂的步骤。例如,通过加入 N-乙基马来酰亚胺或其它硫-反应化合物可以去除还原剂。

[0107] C. 测定高半胱氨酸的试剂盒

[0108] 在另一方面,本发明涉及用于测定样品中 Hcy 的试剂盒,该试剂盒包含:a)Hcy 转化酶;b)Hcy 共底物;和 c)用于评估 Hcy 共底物转化产物的试剂。

[0109] 在一些实施方案中,所述 Hcy 共底物是 S-腺苷甲硫氨酸(SAM),所述 Hcy 转化酶是 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶,所述 Hcy 共底物转化产物是 S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)。在一些实施方案中,用于评估 Hcy 共底物转化产物 SAH 的试剂是与 SAH 特异性结合的抗体。

[0110] 在另一方面,本发明涉及一种测定样品中的 Hcy 的试剂盒,该试剂盒包含:a)S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶;b)S-腺苷甲硫氨酸(SAM)或 ATP, Met 和 SAM 合酶;c)SAH 水解酶;和 d)用于评估腺苷(Ado)的试剂。

[0111] 在还有另一方面,本发明涉及一种测定样品中的 Hcy 的试剂盒,该试剂盒包含:a)S-腺苷甲硫氨酸(SAM)-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶;b)

[0112] S-腺苷甲硫氨酸(SAM)或 ATP, Met 和 SAM 合酶;和 c)用于评估 SAH 的试剂,其中所述试剂盒不包含用于生成 H₂O₂ 的酶或试剂和用于检测 H₂O₂ 的试剂。

[0113] 在一些实施方案中,用于评估 Ado 的试剂包含不同于 SAH 水解酶的腺苷转化酶。在一些实施方案中,腺苷转化酶是腺苷激酶。在其它实施方案中,腺苷转化酶是腺苷脱氨酶。

[0114] 本文所述的试剂盒可以另外包含还原剂,例如二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)-膦盐酸盐(TCEP)。

[0115] 本发明的试剂盒可以是任何适当包装。例如,本文所讨论的涉及诊断系统的包装是通常用于诊断系统的那些。这些包装包括玻璃和塑料,如聚乙烯,聚丙烯和聚碳酸酯,瓶子和小瓶,塑料和塑料-箔层压的包膜等。这些包装还可以包括适用于自动分析仪使用的容器。包装典型地包括用于进行本文所述测定的使用说明。

[0116] D. 实施例

[0117] 包括下列实施例仅仅是用于举例说明的目的而不是意欲限制本发明的范围。

[0118] 实施例 1. GLDH-NADH 偶联以检测通过使用纯化的 SAM 的酶促循环生成的 NH₄⁺

[0119] 在本研究中,使用下列偶联的酶促循环反应:

[0120]



[0121] 腺苷 → 肌苷 + NH₄⁺ (3)

[0122] NH₄⁺ + α-酮戊二酸 + NAD(P)H → 谷氨酸 + NAD(P) (4)

[0123] 在方案(1)中,通过 SAM-依赖性高半胱氨酸 S-甲基转移酶催化反应。在方案(2)

中,通过 SAH 水解酶催化反应。在方案 (3) 中,通过腺苷脱氨酶催化反应。在方案 (4) 中,通过 L-谷氨酸脱氢酶催化反应。通过分光光度计法在 340nm 下检测 NAD(P)^+ 。用于本研究的试剂的更详细的描述在下表 1 和 2 中列出。

[0124] 表 1. 试剂 1 的组成

[0125]

化学试剂 1	浓度
磷酸钾	15mM
NAD(P)H	5 mM
GLDH	2KU/L
BSA	1.2g/L
腺苷脱氨酶	50KU/L
高半胱氨酸甲基转移酶	10KU/L
DTT	0.2mM
α -酮戊二酸	30mM
SAM	3 mM

[0126] 表 2. 试剂 2 的组成

[0127]

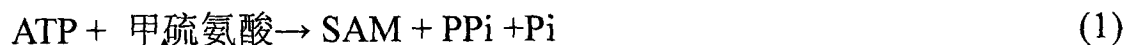
化学试剂 2	浓度
Tris-HCl	15mM
BSA	1.2g/L
SAH 水解酶	10KU/L

[0128] 在本研究中,将 180 μ l 的试剂 1 与 20 μ l 待测的血清或血浆样品混合,将该混合物在 37°C 温育 5 分钟。然后向混合物中加入六十 (60) μ l 试剂 2,并且在 37°C 温育另外 5 分钟。在加入试剂 2 以后测量在 340nm 下的吸光度的变化 2-5 分钟。一个例举性的检测结果在图 2 中显示。

[0129] 实施例 2. GLDH-NADH 偶联以检测使用 SAM 的酶促循环生成的 NH_4^+ , SAM 同时通过 SAM 合酶由 ATP 和甲硫氨酸转化

[0130] 在本研究中,使用下列偶联的酶促循环反应:

[0131]



[0132] 腺苷 \rightarrow 肌苷 + NH_4^+ (4)

[0133] NH_4^+ + α -酮戊二酸 + NAD(P)H \rightarrow 谷氨酸 + NAD(P) (5)

[0134] 在方案 (1) 中,通过 SAM 合酶催化反应。在方案 (2) 中,通过 SAM- 依赖性高半胱氨酸 S- 甲基转移酶催化反应。在方案 (3) 中,通过 SAH 水解酶催化反应。在方案 (4) 中,通过腺苷脱氨酶催化反应。在方案 (5) 中,通过 L- 谷氨酸脱氢酶催化反应。通过分光光度计法在 340nm 下检测 NAD(P)^+ 。用于本研究的试剂的更详细的描述在下列表 3 和 4 中阐明。

[0135] 表 3. 试剂 3 的组成

[0136]

化学试剂 3	浓度
Good's 缓冲液	15mM
NAD(P)H	5 mM
GLDH	2KU/L
BSA	1.2g/L
TCEP	0.2mM
α -酮戊二酸	30mM
ATP	10 mM
甲硫氨酸	5 mM
SAM 合酶	10KU/L
腺苷脱氨酶	50KU/L
高半胱氨酸甲基转移酶	20KU/L
ZnCl ₂	10 mM

表 4. 试剂 4 的组成

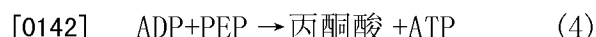
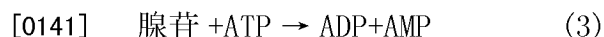
化学试剂 4	浓度
磷酸钠	15mM
BSA	1.2g/L
SAH 水解酶	10KU/L

[0137] 在该研究中,将 270 μ l 试剂 1 与 20 μ l 待测血清或血浆样品混合,将混合物在 37°C 下温育 5 分钟。然后向该混合物中加入九十 (90) μ l 试剂 2,在 37°C 下温育另外 5 分钟。在加入试剂 2 后测量在 340nm 下吸光度的变化 2-5 分钟。

[0138] 实施例 3. 腺苷激酶 - 丙酮酸激酶 - 乳酸脱氢酶 - NADH 偶联以检测通过酶促循环生成的腺苷

[0139] 在该研究中,使用下列偶联的酶促循环反应:

[0140]



[0144] 在方案 (1) 中,通过 SAM- 依赖性高半胱氨酸 S- 甲基转移酶催化反应。在方案 (2) 中,通过 SAH 水解酶催化反应。在方案 (3) 中,通过腺苷激酶催化反应。在方案 (4) 中,通过丙酮酸激酶催化反应。在方案 (5) 中,通过乳酸脱氢酶催化反应。通过分光光度计法在 340nm 下检测 NAD(P)^+ 。用于本研究的试剂的更详细的描述在下列表 5 和 6 中阐明。

[0145] 表 5. 试剂 5 的组成

[0146]

化学试剂 5	浓度
磷酸钾	15mM
NADH	5 mM
GLDH	2KU/L
BSA	1.2g/L
腺苷激酶	10KU/L
高半胱氨酸甲基转移酶	10KU/L
DTT	0.2mM
MgCl ₂	15 mM
丙酮酸激酶	5KU/L
乳酸脱氢酶	25KU/L
SAM	3 mM

[0147] 表 6. 试剂 6 的组成

[0148]

化学试剂 6	浓度
Tris-HCl	15mM
BSA	1.2g/L
SAH 水解酶	10KU/L

[0149] 在该研究中,将 180 μ l 试剂与 20 μ l 待测血清或血浆样品混合,将混合物在 37°C 下温育 5 分钟。然后向该混合物中加入六十 (60) μ l 试剂 2,在 37°C 下温育另外 5 分钟。在加入试剂 2 后测量在 340nm 下吸光度的变化 2-5 分钟。

[0150] 实施例 4. 例举性 Diazyme 高半胱氨酸酶促测定与 Catch 高半胱氨酸测定之间的比较

[0151] 在 Cobas Mira 分析仪和 Beckman Synchron CX-7 分析仪上,为了证明准确性,用单个的血清样品检测例举性的 Diazyme 高半胱氨酸酶促测定与 Catch 高半胱氨酸测定比较。按照实施例 1 所示步骤进行例举性的 Diazyme 高半胱氨酸酶促测定。Catch 高半胱氨酸测定在美国专利号 6,174,696 和 6,436,658 中描述。

[0152] 用于本研究的个体患者血清样品来自检定的商购来源,ProMedDx, LLC。血清样品通过 IRB 检定,即用于收集样品的方案和知情同意书经 IRB 批准。为了确保高半胱氨酸浓度分布在可报道的动态范围内,用高半胱氨酸贮液将用于研究的一些高半胱氨酸血清样品强化 (spike) 至目标浓度。

[0153] 在一个测试中,在 Cobas Mira 分析仪上比较例举性的 Diazyme 高半胱氨酸酶促测定与 Catch 高半胱氨酸测定。检测总共 47 个血清样品。获得的高半胱氨酸值的比较结果在下表 7 中显示。

[0154] 表 7. 在 Cobas Mira 分析仪上 Diazyme 和 Catch 高半胱氨酸测定的比较

[0155]

样品 ID	Catch [HCY] μ M	Diazyme [HCY] μ M
1	22.8	23.7
2	15.7	17.1
3	15.9	18.2
4	17.7	19.5
5	19.9	20.3
6	23.2	25
7	23.9	24.8

8	27	29.3
9	28.5	32.7
10	28.3	32.5
11	35.4	36.8
12	30.9	30.7
13	27.5	28.4
14	36	39.4
15	33.3	36.5
16	32.6	35.1
17	35.8	38.7
18	37.5	39.6
19	36.9	41.4
20	30.3	35.4
21	15.7	18.9
22	8.8	10
23	7.6	11.1
24	7.7	11.3
25	9	12
26	11.3	14.3
27	9.1	10.7
28	11.2	15.1
29	12.5	20
30	12.2	12.9
31	10.8	14

32	12.1	15.1
33	7.4	9.6
34	15.9	19.5
35	10.6	12.3
36	9.5	10.7
37	12.4	15.3
38	10.9	13
39	8.3	12
40	30.6	29.3
41	12.5	10.8
42	10.3	7.6
43	10.3	9.8
44	7.3	9.3
45	10.8	9.1
46	9.4	8.1
47	8	8.3

[0156] 使用Diazyme 高半胱氨酸酶促测定获得的高半胱氨酸浓度也针对使用Catch 高半胱氨酸测定获得的高半胱氨酸浓度作图。如图3所示,斜率为1.029,两种方法之间的相关系数是0.97,并且y截距是1.47。

[0157] 在另一测试中,在Beckman Synchron CX-7分析仪上比较例举性的Diazyme 高半胱氨酸酶促测定和Catch 高半胱氨酸测定。检测总共15个血清样品。高半胱氨酸值的比较结果在下表8中显示。

[0158] 表8. 在Beckman Synchron CX-7分析仪上Diazyme 和Catch 高半胱氨酸测定的比较

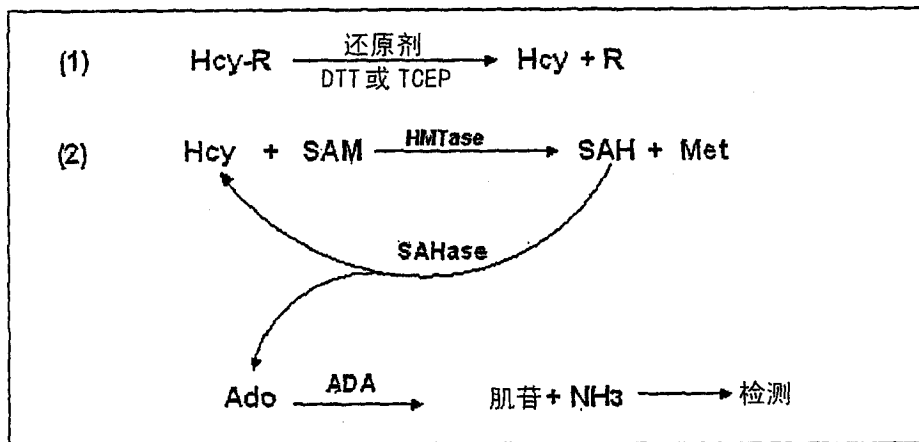
[0159]

样品 ID	Diazyme[HCY] μ M	Catch[HCY] μ M
1	7.7	7
2	14.1	12
3	29.8	29.5
4	9.5	10.5
5	12.4	12.4
6	11.8	12
7	8.6	8.2
8	33.4	34
9	32.4	32.8
10	33.2	35.8
11	28	28.4
12	35.6	38.6
13	34.4	35.8
14	36.4	37.4
15	34.3	36.6

[0160] 使用 Diazyme 高半胱氨酸酶促测定获得的高半胱氨酸浓度也针对使用 Catch 高半胱氨酸测定获得的高半胱氨酸浓度作图。如图 4 所示,斜率为 1.07,两种方法之间的相关系数是 0.99,并且 y 截距是 -1.14。

[0161] 包括上述实施例仅仅是为了举例说明的目的,而不是意欲限制本发明的范围。可以有对上述那些的许多变化。由于对上述实施例的改进和变化对于本领域技术人员是显而易见的,意欲本发明仅受后附权利要求的范围所限制。

高半胱氨酸的基于共底物转化产物的酶循环测定



Hcy-R: 氧化的高半胱氨酸, R: 蛋白质, Hcy, Cys 或其它硫化化合物;
Hcy: 还原型高半胱氨酸 (底物)
SAM: S-腺苷-L-甲硫氨酸 (共底物); HMTase: 高半胱氨酸-甲硫氨酸甲基转移酶
SAH: S-腺苷-L-高半胱氨酸 (共底物转化产物);
SAHase: S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶; ADA: 腺苷脱氨酶

图 1

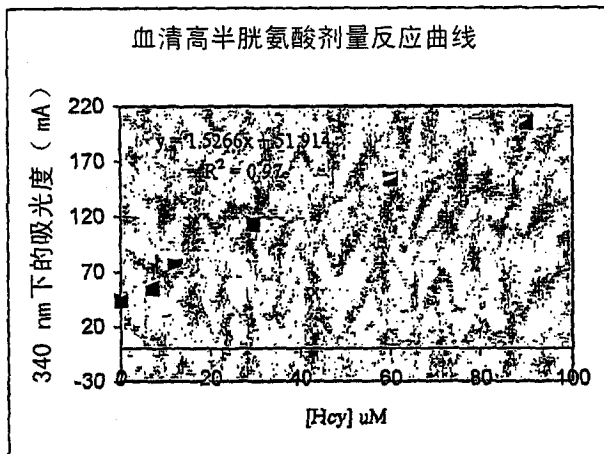


图 2

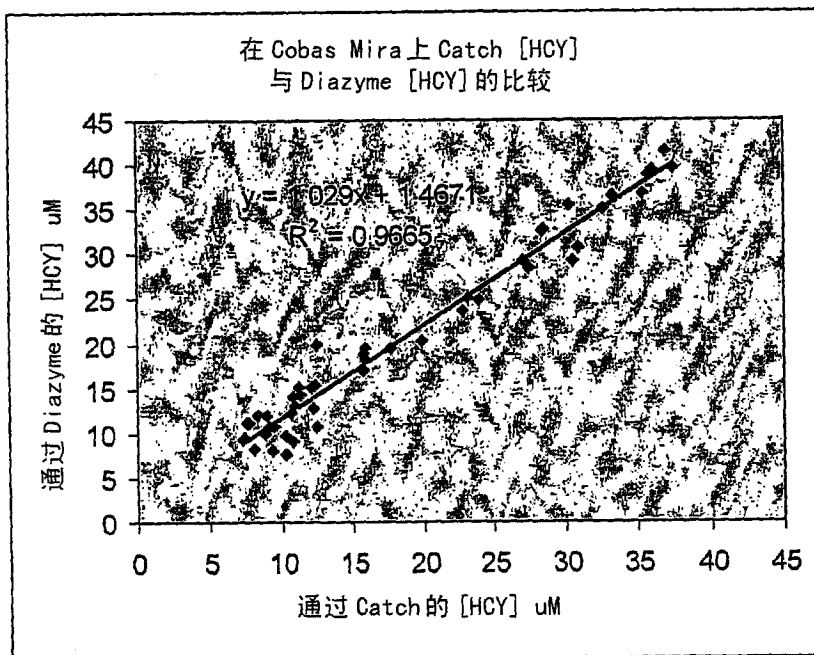


图 3

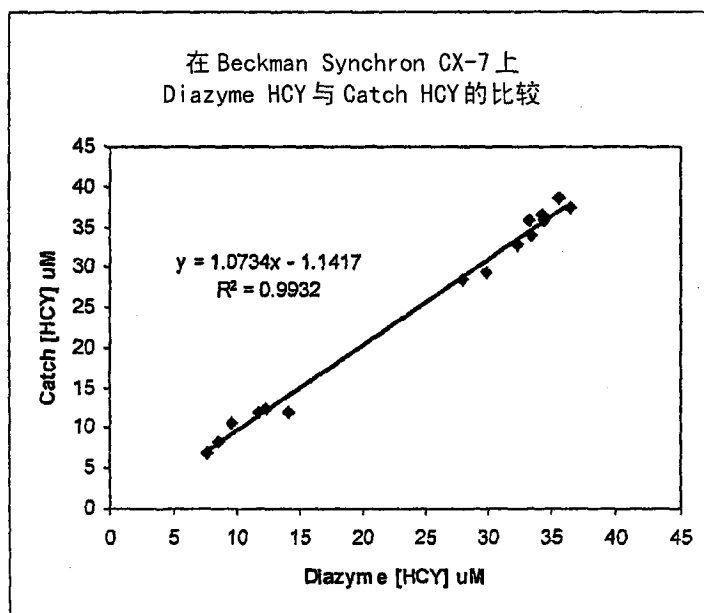


图 4