

一种新型 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶检测试剂

技术领域

本发明涉及一种新型 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶检测试剂。

背景技术

N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase, NAG), 又称尿酶, 是分子量为 140kD 的一种存在于细胞溶酶体内的酸性水解酶, 在人体内主要存在于肾的近曲小管上皮细胞中。研究表明, NAG 对肾小管损伤的反应非常灵敏, 比其他尿中低分子蛋白更迅速、直接地反应肾小管活动性损伤的程度和病情变化, 但在健康人尿中含量甚微。此外, 用尿作标本, 又是一种无创伤性检查, 符合当代医学检验方法的潮流, 适合于日常检验和连续动态分析。由此可见, 通过测定尿中 NAG 的活性, 对糖尿病, 各种肾实质疾患, 药物及重金属肾中毒, 尿路感染 (肾盂肾炎), 移植肾排斥反应, 高血压及自身免疫性疾病等原因造成的肾小管损伤早期检测具有重要的临床应用价值。

目前, NAG 活性检测方法有放免分析法、荧光分析法和可见分光光度法等。其中放免分析法和荧光分析法所需仪器价格昂贵, 且对底物溶液配制的要求较高而不适用于临床大流量的自动化分析; 而在已报道的分光光度法中, 均存在底物溶解性差或试剂稳定性欠佳等问题, 难以满足临床检验要求。

发明内容

针对现有技术中的不足, 本发明提供了一种稳定性好、灵敏度高、无需复溶直接使用的检测试剂及检测方法。

一种 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶的检测试剂, 所述检测试剂是由试剂 R1 和试剂 R2 两个试剂组成,

所述试剂 R1 包括以下浓度的组分:

柠檬酸缓冲液	150~300 mmol/L
底物	1~5 mmol/L
BSA	3~5 g/L
氯化镁	0.5~5 g/L
EDTA·2Na	0.5~5 g/L
Trixon-X100	2~5 ml/L
SDS	0.5~5 g/L
亚硫酸钠	0.01~1 g/L
聚乙二醇 6000	0.01~2 g/L
乙二醇	0.5~3 ml/L
葡萄糖	5~30 g/L
β环糊精	0.1~3 g/L
冠 18 醚	0.1~3 g/L
防腐剂	0.1~3 g/L

所述试剂 R2 包括以下浓度的组分：

碳酸盐缓冲液	150~500mmol/L
吐温 20	1~10 ml/L
尿素	1.5~5 g/L
BSA	0.1~10 g/L
防腐剂	0.1~3g/L

作为优选，所述底物为 5-[4-(3-甲氧基-苯基)-噻吩-2-基]-N-乙酰氨基-β-D-葡萄糖苷(VRA-NAG)。

进一步的，所述的 BSA 是牛血清白蛋白，SDS 是十二烷基硫酸钠，EDTA·2Na 是乙二胺四乙酸二钠。

作为优选，所述防腐剂为叠氮钠、NaN₃、对羟基苯甲酸甲酯中的一种。

进一步的，所述的尿液 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶检测试剂，其中 R1 缓冲液为 15~30℃，pH 为 4.0~6.0 的柠檬酸缓冲液。

进一步的，所述的尿液 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶检测试剂，其试

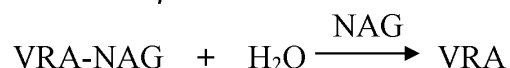
剂 R2 中缓冲液为 15~30℃, pH 为 11.0~12.0 的碳酸盐缓冲液。

进一步的, 所述的尿液 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶检测试剂来检测尿液 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶的检测方法, 使用全自动生化分析仪利用终点法进行测定, 检测主波长为 505nm。

进一步的, 试剂 R1 和试剂 R2 的比例为 3:1。

本发明的基本原理如下:

尿液中的 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶在酸性环境下将试剂中的 5-[4-(3-甲氧基-苯甲烯)]-饶丹宁-3-乙酸铵-N-乙酰氨基-β-D-葡萄糖苷(VRA-NAG)催化水解为 5-[4-(3-甲氧基-苯甲烯)]-饶丹宁-3-乙酸铵(VRA), 接着 VRA 在强碱性环境下变构产生荧光, 溶液呈现紫红色, 并在 505nm 的波长处有吸收峰, 通过检测 505nm 波长处吸光度的变化可以确定 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶的活性。



注: VRA-NAG: 5-[4-(3-甲氧基-苯甲烯)]-饶丹宁-3-乙酸铵-N-乙酰氨基-β-D-葡萄糖苷, 分子量 545。

NAG: N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶

VRA: 5-[4-(3-甲氧基-苯甲烯)]-饶丹宁-3-乙酸铵

本发明的有益效果:

1) 采用新的 5-[4-(3-甲氧基-苯甲烯)]-饶丹宁-3-乙酸铵-N-乙酰氨基-β-D-葡萄糖苷(VRA-NAG)为反应底物, 既解决了试剂色原干扰大的问题又显著增强了底物的溶解性和试剂准确度;

2) 本发明首次使用镁离子作为底物螯合剂, 镁离子与具有环状结构的 VRA-NAG 螯和形成六原子环的螯合物, 增强了试剂的稳定性;

3) 试剂的准确度和稳定性良好, 抗干扰性强, 使用方便, 符合临床批量检测需求。

附图说明

图 1 为本发明的 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶的检测试剂中实施例 1

的相关性曲线图；

图 2 为本发明的 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶的检测试剂中实施例 2 的相关性曲线图；

图 3 为本发明的 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶的检测试剂中实施例 3 的相关性曲线图；

图 4 为本发明的 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶的检测试剂中实施例 1-3 与对比例的有效期稳定性曲线图。

具体实施方式

为使本发明要解决的技术问题、技术方案和优点更加清楚，下面将结合具体实施例和附图进行详细描述。

实施例 1：

本实施例的 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶的检测试剂，包含试剂 R1 和试剂 R2，其中：

试剂 R1 的成分和含量如下：

柠檬酸缓冲液(pH=4.0， 15℃)	200 mmol/L
VRA-NAG	3 mmol/L
BSA	5 g/L
氯化镁	1 g/L
EDTA·2Na	2 g/L
Trixon-X100	3 ml/L
SDS	1 g/L
亚硫酸钠	0.1 g/L
聚乙二醇 6000	0.5 g/L
乙二醇	0.9 ml/L
葡萄糖	20 g/L
β环糊精	2 g/L
冠 18 醚	2 g/L

NaNO ₃	1 g/L
试剂 R2 的成分和含量如下:	
碳酸盐缓冲(pH=11, 15°C)	200mmol/L
吐温 20	2 ml/L
尿素	3 g/L
BSA	1 g/L
NaNO ₃	0.5 g/L

本检测试剂的使用方法:

本实施例描述的尿液 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶检测试剂, 应使用具有双试剂功能的全自动生化分析仪进行检测, 如日立 7180 全自动分析仪、日立 7080 全自动分析仪以及迈瑞 800 等, 利用终点法进行测定, 设定检测主波长为 505nm。将检测试剂 R1 和 R2 按照 3:1 的比例放置到对应的试剂位上, 在样品盘放置好双蒸水、校准品、质控品和待测样本, 操作如表 1:

表 1 实施例 1 试剂检测方法

溶液加入	空白管	标准管 1	标准管 2	测定管
试剂 R1	180μL	180μL	180μL	180μL
蒸馏水	6μL	—	—	—
校准品	—	6μL	—	—
质控品	—	—	6μL	—
待测样本	—	—	—	6μL
混合, 于 37°C下恒温预孵育 5 分钟, 记录吸光度 A1				
试剂 R2	60μL	60μL	60μL	60μL
混匀, 反应 5 分钟后, 在主波长 505nm 下记录吸光度 A2, 计算ΔA。				

计算公式: 尿液 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶浓度(U/L)= (样本ΔA÷校准品ΔA) ×校准品浓度。

实施例 2:

本实施例的 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶的检测试剂, 包含试剂 R1 和试剂

R2, 其中:

试剂 R1 的成分和含量如下:

柠檬酸缓冲液(pH=5.0, 20°C)	150 mmol/L
VRA-NAG	1 mmol/L
BSA	3 g/L
氯化镁	0.5 g/L
EDTA·2Na	0.5 g/L
Trixon-X100	2 ml/L
SDS	0.5 g/L
亚硫酸钠	0.01 g/L
聚乙二醇 6000	0.01 g/L
乙二醇	0.5 ml/L
葡萄糖	5 g/L
β环糊精	0.1 g/L
冠 18 醚	0.1 g/L
叠氮钠	0.1 g/L

试剂 R2 的成分和含量如下:

碳酸盐缓冲(pH=11.5, 20°C)	150 mmol/L
吐温 20	1 ml/L
尿素	1.5 g/L
BSA	0.1 g/L
叠氮钠	0.1 g/L

使用方法与检测方法同实施例 1。

实施例 3:

本实施例的 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶的检测试剂, 包含试剂 R1 和试剂

R2, 其中:

试剂 R1 的成分和含量如下:

柠檬酸缓冲液(pH=6.0, 25°C)	300 mmol/L
----------------------	------------

VRA-NAG	5 mmol/L
BSA	5 g/L
氯化镁	5 g/L
EDTA·2Na	5 g/L
Trixon-X100	5 ml/L
SDS	5 g/L
亚硫酸钠	1 g/L
聚乙二醇 6000	2 g/L
乙二醇	3 ml/L
葡萄糖	30 g/L
β环糊精	3 g/L
冠 18 醚	3 g/L
对羟基苯甲酸甲酯	3 g/L
试剂 R2 的成分和含量如下：	
碳酸盐缓冲(pH=11.5, 25℃)	500 mmol/L
吐温 20	10 ml/L
尿素	5 g/L
BSA	10 g/L
对羟基苯甲酸甲酯	3 g/L

使用方法与检测方法同实施例 1。

实施例 4：

干扰性实验：取新鲜混合尿液，分成 2 等份，然后将每等份再分成 6 等份，加入不同的干扰物质，使其浓度在尿液中达到表 2 的要求。然后分别用实施例所得试剂，与市场常见并认可的尿液 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶检测试剂作为对照组同时对比测定尿液中 NAG 的含量，对照试剂组测定结果与加入不同干扰物质后各组的测定结果见表 2。

相对偏差(%)=(干扰样本的测定均值－对照样本的测定均值)/对照样本的测定均值×100%。

表 2 实施例试剂抗干扰性能比较

干扰物质种类	干扰物质浓度	实施例 1		实施例 2		实施例 3		对照组	
		NAG均值 (U/L)	相对偏差	NAG均值 (U/L)	相对偏差	NAG均值 (U/L)	相对偏差	NAG均值 (U/L)	相对偏差
无干扰物 (空白组)	0	11.3	0.00	11.3	0.00	11.5	0.00	11.5	0.00
葡萄糖 (mmol/L)	20	11.2	-0.88%	11.7	3.54%	11.8	2.61%	12.3	5.09%
胆红素 (mg/dL)	40	11.5	1.77%	11.9	5.31%	11.8	2.61%	12.1	6.96%
血红蛋白 (mg/dL)	200	11.0	-2.65%	11.6	2.65%	10.9	-5.22%	10.4	-9.57%
甘油三酯 (mg/dL)	500	11.5	1.77%	11.7	3.54%	11.7	1.74%	10.9	-5.22%
抗坏血酸 (mg/dL)	50	11.3	0.00%	12.0	6.19%	11.0	-4.35%	12.6	9.57%

由表 2 可以看出，实施例 1-3 的检测试剂在葡萄糖≤20mmol/L、胆红素≤40mg/dL、血红蛋白≤200mg/dL、甘油三酯≤500mg/dL 以及抗坏血酸≤50mg/dL 时对测试结果没有明显干扰。而对照组试剂在上述浓度干扰物质存在时，受到明显干扰，这说明通过采用新型底物 5-[4-(3-甲氧基-苯甲烯)]-饶丹宁-3-乙酸铵-N-乙酰氨基-β-D-葡萄糖苷(VRA-NAG)为反应底物，并使用镁离子作为底物螯合剂，可以有效加强检测试剂的抗干扰能力，避免如葡萄糖、胆红素和抗坏血酸等干扰，实施例组的试剂抗干扰性能显著提高，远远优于对照试剂。

实施例 5:

相关性实验：利用实施例所述试剂配方配制检测试剂，与市场常见的国家食品药品监督管理局认可的某公司的 N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶检测试

剂盒进行对照检测，各实施例组分别检测了 40 个临床尿液样本，检测结果如表 3 所示。并获得各实施例与对照组的相关性曲线（如图 1 所示），通过检测结果显示，实施例 1 与对照组的相关系数为 0.9979，实施例 2 与对照组的相关系数为 0.9949，实施例 3 与对照组的相关系数为 0.9962，各实施例组试剂与对照组试剂 40 个样本的相对偏差均 $\leq 10\%$ ，说明了实施例 1-3 组与对照组有极大的相关性。

表 3 实施例试剂与市场常见并得到认可的尿液 N-乙酰- β -D 葡萄糖苷酶检测试剂盒对比检测结果

样本号	实施例 1 (U/L)	实施例 2 (U/L)	实施例 3 (U/L)	对照组 (U/L)	相对偏差
1	2.10	2.05	2.14	2.15	2.38%
2	0.50	0.5	0.61	0.53	6.00%
3	1.55	1.59	1.63	1.50	-3.23%
4	2.34	2.07	2.2	2.15	-8.12%
5	2.64	2.35	2.51	2.65	0.38%
6	1.20	1.04	1.23	1.15	-4.17%
7	7.56	7.21	7.78	7.75	2.51%
8	7.91	7.33	8.22	7.85	-0.76%
9	0.31	0.3	0.33	0.33	6.45%
10	0.85	0.79	0.87	0.80	-5.88%
11	0.75	0.72	0.88	0.80	6.67%
12	0.57	0.55	0.59	0.60	5.26%
13	6.55	6.17	6.79	6.66	1.68%
14	2.45	2.22	2.56	2.30	-6.12%
15	1.73	1.59	1.87	1.73	0.00%
16	5.66	5.51	5.74	5.55	-1.94%
17	0.96	0.91	1.11	1.02	6.25%

18	6.52	6.22	6.84	6.35	-2.61%
19	2.10	1.97	2.31	2.00	-4.76%
20	1.50	1.48	1.58	1.50	0.00%
21	2.64	2.56	2.9	2.81	6.44%
22	1.30	1.16	1.40	1.18	-9.23%
23	1.50	1.32	1.67	1.45	-3.33%
24	10.01	9.8	10.07	9.85	-1.60%
25	3.80	2.4	3.82	3.50	-7.89%
26	2.15	2.11	2.31	2.22	3.26%
27	1.40	1.19	1.55	1.30	-7.14%
28	5.70	5.57	5.68	5.55	-2.63%
29	10.04	9.44	10.98	9.78	-2.59%
30	1.50	1.31	1.57	1.50	0.00%
31	3.15	2.99	3.59	3.35	6.35%
32	1.20	1.1	1.35	1.30	8.33%
33	2.70	2.5	2.86	2.57	-4.81%
34	6.95	6.66	7.24	6.70	-3.60%
35	9.06	8.54	9.38	8.80	-2.87%
36	4.50	4.31	4.87	4.35	-3.33%
37	2.60	2.38	3.19	2.80	7.69%
38	0.90	0.9	0.92	0.91	1.11%
39	1.00	0.97	1.22	1.10	10.00%
40	8.67	8.51	8.97	8.80	2.92%
相关性	0.9979	0.9949	0.9962	/	/

实施例 6:

试剂的稳定性对比试验：对实施例 1-3 中的试剂，每组实施例分别均匀分装 13 组，每组的装量：试剂 R1 为 18mL，试剂 R2 为 6mL；并且取

13 组市场常见的国家食品药品监督管理局认可的某公司的 N-乙酰- β -D 葡萄糖苷酶检测试剂盒作对照。放置到 2-8°C 冰箱中，每月的同一天取出一组试剂检测 NAG 质控品（靶值为 25.8 μ mol/L），检测结果如图 2 所示，实施例 1-3 试剂在 2-8°C 储存条件下比市场常见的 N-乙酰- β -D 葡萄糖苷酶检测试剂盒更加稳定。

通过验证，本试剂与同类检测试剂对比相关性好，临床检测样本结果一致，能够达到市场对产品的应用要求，并且抗干扰性能好，是一种更加稳定、良好的 N-乙酰- β -D 葡萄糖苷酶检测试剂。