



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114910579 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202210388573.0

(22) 申请日 2022.04.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114910579 A

(43) 申请公布日 2022.08.16

(73) 专利权人 中国药科大学
地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道639号

专利权人 江苏省人民医院(南京医科大学第一附属医院)

(72) 发明人 阿基业 王广基 孔祥清 阿楠
陆振耀 余梦杰

(74) 专利代理机构 北京和联顺知识产权代理有限公司 11621

专利代理师 朱守鑫

(51) Int.Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

审查员 周蓉

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

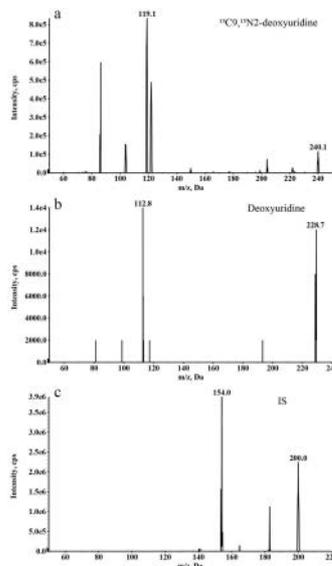
(54) 发明名称

血清中脱氧尿苷定量测定方法及在心肌梗死诊断中的应用

(57) 摘要

本发明公开了血清中脱氧尿苷定量测定方法,包括以下步骤:步骤1:¹³C9,¹⁵N2-脱氧尿苷储备液和标准溶液的配制;步骤2:血清样本中加入内标及样品处理;步骤3:采用液相系统、色谱柱和质谱仪对步骤2中处理后的血清样本进行HILIC-MS/MS检测,包括内源性脱氧尿苷和内标的测定;步骤4:同步骤2配制含系列浓度稳定同位素¹³C9,¹⁵N2-脱氧尿苷的标准曲线溶液,同步骤3测定稳定同位素¹³C9,¹⁵N2-脱氧尿苷及内标,获得标准工作曲线;步骤5:根据步骤3、4结果,经内标校正后,计算并获得血清样品中内源性脱氧尿苷浓度。本发明建立了一种简单、可靠且重复性好的血清中内源性脱氧尿苷的定量方法,并成功应用于测定正常受试者以及心肌梗死病人血清脱氧尿苷水平。

CN 114910579 B



1. 血清中脱氧尿苷定量测定方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1:储备液及工作液配制,包括 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷储备液的配制和内标储备液的配制;

其中 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷储备液的配制包括以下步骤:先取25mM的 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷标准品溶液适量溶解于超纯水中配制成相当于1.0mg/mL储备液,置-20°C冰箱中保存,然后临用时用超纯水稀释成系列工作液浓度;

其中内标储备液的配制包括以下步骤:先精密称取4-氯-DL-氯苯丙氨酸溶解于超纯水中配制成相当于1mg/mL储备液,临用时用甲醇稀释到1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为蛋白沉淀剂;

步骤2:血清样本的处理,其中处理方法包括以下步骤:

S2.1:取50 μL 血清样本,加入200 μL 含内标甲醇,震荡5min沉淀蛋白后4°C冰箱静置30min;

S2.2:随后对静置后的血清样本进行离心处理,取上清液180 μL 减压挥干;

S2.3:再加入100 μL 超纯水,震荡5min后,再进行离心处理,然后取上清5 μL 进样;

步骤3:采用液相系统、色谱柱和质谱仪对步骤2中处理后的血清样本进行HILIC-MS/MS参数的检测;

步骤4:标准曲线溶液配制及分析:选取若干人体血清样本混匀,分别取45 μL 的混合血清,加入5 μL 步骤1中制备的不同浓度的 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷系列工作液,配制成终浓度分别为0.3、1、3、10、30、100ng/mL的标准血清样本,按步骤3中的方法处理进样分析;所述步骤1中工作液浓度为3、10、30、100、300和1000ng/mL,所述S2.2和S2.3中的离心处理具体参数为18000 \times rpm、4°C离心10min,所述步骤3中液相系统包括LC-30A二元泵,

SIL-30AC自动进样器和CTO-30AC柱温箱;

色谱柱型号为Amide XBridge HPLC column,3.5 μm ;4.6mm \times 100mm;Waters;柱温40°C;流动相A为含0.1%甲酸和5mM甲酸铵水,流动相B为乙腈,流动相梯度:0-2min,85%B;2-5min,85-20%B;5-8min,20%B;8-10min,20-85%B;10-14min,85%B;流动相流速为0.4mL/min;

质谱仪采用Applied Biosystems API 4000三重四级杆质谱仪,采用ESI源正离子检测,扫描模式为MRM,分析物的MS/MS参数和保留时间;质谱参数如下所示:离子源温度为50°C;离子喷雾电压为4.5kV;curtain gas设置为30;离子源气体1设置为55;离子源气体2设置为55。

血清中脱氧尿苷定量测定方法及在心肌梗死诊断中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及血清中脱氧尿苷定量测定方法及在心肌梗死诊断中的应用。

背景技术

[0002] 急性心肌梗死发生迅速、危害极大,因心肌梗死损伤的不可逆性,急性心梗的早期识别、危险分级一直是急性心梗诊疗的基础与重点,及时诊断、早期诊断极为重要。这对及早介入和救治、赢得宝贵时间,临床意义重大。心肌损伤的标志物是识别与预警急性心梗的重要辅助工具,相关的科学探索研究从未停止进行。但目前临床上应用的急性心肌标志物在疾病发展中变化的背后原理不尽相同,通常代表心肌受到损害(如肌钙蛋白家族成员、谷草转氨酶等)或炎症状态(MPO、CRP等)两者其一,容易受到疾病或者外部不同因素的干扰,且随检测时间不同有不稳定的波动问题,影响临床准确诊断。冠脉造影的方法虽然准确可靠,但操作复杂、对身体有损伤,尤其是在条件不具备的边远地区、或者医护人员缺乏、医疗资源缺乏、紧张情况下,难以开展,也不适合大规模的高危人群普筛。临床上亟需研究和发现简单、可靠的急性心梗早期预警和诊断标志物。

[0003] 越来越多的研究发现,急性心梗的发生、发展并不孤立,急性心梗发生、发展过程中,广泛涉及到循环免疫系统的变化,而循环免疫系统中,包含中性粒细胞、巨噬细胞等循环细胞的活动、功能改变,一定伴随着基础物质代谢-分子水平的改变。代谢物是生命活动的下游分子,血浆/血清中的代谢物变化与循环细胞功能、状态密不可分,甚至直接决定着循环细胞的活力与功能。

[0004] 近年来,基于循环系统研究,发现一些与急性心梗代谢发生相关标记物,但大部分的代谢标志物研究仍处于初始起步阶段,绝大部分结果仅基于代谢组学全谱扫描、非绝对定量方法测定结果,因此需要进一步建立准确、可靠的绝对定量方法,对其体内水平进行准确定量,增强其真正的临床应用价值。

发明内容

[0005] 1.要解决的技术问题

[0006] 本发明的目的是为了解决现有技术中无法准确定量测定内源性脱氧尿苷浓度,以及无法消除人体内源性脱氧尿苷的测定干扰的问题,而提出的血清中脱氧尿苷定量测定方法及在心肌梗死诊断中的应用。

[0007] 2.技术方案

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0009] 血清中脱氧尿苷定量测定方法,包括以下步骤:

[0010] 步骤1:储备液及工作液配制,包括 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷储备液的配制和内标储备液的配制;

[0011] 其中 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷储备液的配制包括以下步骤:先取 25mM的 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧

尿苷标准品溶液适量溶解于超纯水中配制成相当于1.0mg/mL储备液,置-20℃冰箱中保存,然后临用时用超纯水稀释成系列工作液浓度;

[0012] 其中内标储备液的配制包括以下步骤:先精密称取4-氯-DL-氯苯丙氨酸溶解于超纯水中配制成相当于1mg/mL储备液,临用时用甲醇稀释到1 μ g/mL作为蛋白沉淀剂;

[0013] 步骤2:血清样本的处理,其中处理方法包括以下步骤:

[0014] S2.1:取50 μ L血清样本,加入200 μ L含内标甲醇,震荡5min 沉淀蛋白后4℃冰箱静置30min;

[0015] S2.2:随后对静置后的血清样本进行离心处理,取上清液180 μ L减压挥干;

[0016] S2.3:再加入100 μ L超纯水,震荡5min后,再进行离心处理,然后取上清5 μ L进样;

[0017] 步骤3:采用液相系统、色谱柱和质谱仪对步骤2中处理后的血清样本进行HILIC-MS/MS检测,包括内源性脱氧尿苷和内标的测定;

[0018] 步骤4:标准曲线的分析:选取若干人体血清样本混匀,分别取45 μ L的混合血清,加入5 μ L步骤1中制备的不同浓度的¹³C9, ¹⁵N2-脱氧尿苷系列工作液,配制成终浓度分别为0.3、1、3、10、30、100ng/mL的标准血清样本,按步骤2中的方法处理进样分析。

[0019] 优选地,所述步骤1中工作液浓度为3、10、30、100、300或1000ng/mL。

[0020] 优选地,所述S2.2和S2.3中的离心处理具体参数为18000 \times rpm、4℃离心10min。

[0021] 优选地,所述步骤3中液相系统包括LC-30A二元泵,SIL-30AC自动进样器和CTO-30AC柱温箱(Shimadzu,Kyoto,日本);

[0022] 色谱柱型号为Amide XBridge HPLC column(3.5 μ m;4.6mm \times 100mm;Waters,美国);柱温40℃;水相(流动相A)为含0.1%甲酸和5mM甲酸铵水,有机相(流动相B)为乙腈,流动相梯度:0-2 min,85%B;2-5min,85-20%B;5-8min,20%B;8-10min,20-85%B;10-14min,85%B;流动相流速为0.4mL/min;

[0023] 质谱仪采用AppliedBiosystemsAPI4000三重四级杆质谱仪(AB SCIEX,Foster City,美国),采用ESI源正离子检测,扫描模式为MRM,分析物的MS/MS参数和保留时间;质谱参数如下所示:离子源温度为50℃;离子喷雾电压为4.5kV;curtain gas设置为30;离子源气体1设置为55;离子源气体2设置为55。

[0024] 本发明还提出了血清中脱氧尿苷定量测定方法在心肌梗死诊断中的应用,应用于心肌梗塞的诊断标记物测定。

[0025] 本发明还提出了诊断标记物,为血清中的内源性脱氧尿苷,也可以扩展为血浆、全血中内源性脱氧尿苷。

[0026] 优选地,血清/血浆中脱氧尿苷浓度水平用于诊断心肌梗塞。

[0027] 本发明还提出了心肌梗塞诊断方法,心肌梗塞病人血清/血浆中脱氧尿苷浓度高于5.15 μ g/mL,而健康人群脱氧尿苷浓度低于5.15 μ g/mL。

[0028] 3.有益效果

[0029] 相比于现有技术,本发明的优点在于:

[0030] (1)本发明中,建立了一种¹³C和¹⁵N标记的脱氧尿苷(¹³C9, ¹⁵N2-脱氧尿苷)替代血清中内源性脱氧尿苷的替代分析物的LC-MS/MS定量方法,在Applied Biosystems API 4000三重四级杆质谱仪上采用MRM扫描模式进行检测。首先测定替代分析物和真正分析物响应因子(RF)以消除同位素效应和离子化效率的差异。测定结果显示在线性范围内响

应因子的值恒定且趋近于1,说明可以用血清中系列浓度的 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷建立标准曲线用于定量内源性脱氧尿苷,实验结果表明, $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷特异性良好,灵敏度高,定量下限为0.3ng/mL。人血清中 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷在0.3-100.0ng/mL范围内线性良好,相关系数 $r>0.99$,彻底解决了脱氧尿苷这一内源性物质定量的难题。

[0031] (2) 本发明中,将所建立的内源性脱氧尿苷的定量方法用于测定健康受试者以及心肌梗死病人血清中脱氧尿苷,发现心肌梗死病人血清中脱氧尿苷水平都显著高于正常组,ROC曲线下面积为0.794,提示血清中的脱氧尿苷水平对心肌梗死具有极高的预测性。

[0032] (3) 本发明中,根据测定结果划定了每个组别受试者血清中脱氧尿苷分别于90%和95%置信区间的浓度范围,计算得到cutoff临界值为5.15ng/ml,即按照临床检测结果,高于5.15ng/ml的病人,有79.4%把握诊断为急性心梗,为临床应用提供了可以直接参考的指标。预计在临床上联合脱氧尿苷、高敏肌钙蛋白hs-TnT两个测定指标,可以更为准确地对急性心梗进行诊断。

附图说明

[0033] 图1为 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷、脱氧尿苷和内标的MRM质谱图;

[0034] 其中a:脱氧尿苷质谱图;b: $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷质谱图;c:内标质谱图;

[0035] 图2为特异性色谱图;

[0036] 其中a:人空白血清中的 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷色谱图;b:人血清标曲中的 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷色谱图(300ng/mL);c:人血清中内源性脱氧尿苷色谱图;d:人血清中内标色谱图;

[0037] 图3为人血清中 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷标准曲线;

[0038] 图4为正常受试者与心肌梗死病人血清中脱氧尿苷定量结果;

[0039] 其中,Health代表健康受试者组别,MI代表心肌梗死病人组别;

[0040] * $p<0.05$,** $p<0.01$ 以及*** $p<0.001$ vs健康组;

[0041] 图5为ROC曲线分析图。

具体实施方式

[0042] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。

[0043] 实施例1:

[0044] 参照图1至图5,血清中脱氧尿苷定量测定方法,包括以下步骤:

[0045] 步骤1: $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷储备液的配制:取25mM的 $^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_2$ -脱氧尿苷标准品溶液适量溶解于超纯水中配制成相当于1.0 mg/mL储备液,置-20°C冰箱中保存,临用时用超纯水稀释成系列工作液浓度(3、10、30、100、300、1000ng/mL)。内标储备液的配制:精密称取4-氯-DL-氯苯丙氨酸溶解于超纯水中配制成相当于1mg/mL储备液,临用时用甲醇稀释到1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为蛋白沉淀剂;

[0046] 步骤2:血清样本的处理,取50 μL 血清样本,加入200 μL 含内标甲醇,震荡5min沉淀蛋白后4°C冰箱静置30min。随后18000 \times rpm、4°C离心10min,取上清液180 μL 减压挥干,再加入100 μL 超纯水,震荡5min后,18000 \times rpm、4°C离心10min,取上清5 μL 进样;

[0047] 步骤3:采用液相系统、色谱柱和质谱仪对步骤2中处理后的血清样本进行HILIC-MS/MS参数的检测;

[0048] 液相系统包括LC-30A二元泵, SIL-30AC自动进样器和CTO-30AC柱温箱(Shimadzu, Kyoto, 日本)。色谱柱型号为Amide XBridge HPLC column (3.5 μ m; 4.6mm \times 100mm; Waters, 美国); 柱温40 $^{\circ}$ C; 水相(流动相A)为含0.1%甲酸和5mM甲酸铵水, 有机相(流动相B)为乙腈, 流动相梯度: 0-2min, 85%B; 2-5min, 85-20%B; 5-8min, 20%B; 8-10min, 20-85%B; 10-14min, 85%B; 流动相流速为0.4mL/min;

[0049] 采用Applied Biosystems API 4000三重四级杆质谱仪(AB SCIEX, FosterCity, 美国), 采用ESI源正离子检测, 扫描模式为MRM, 分析物的MS/MS参数和保留时间如表1。

[0050] 其他质谱参数如下所示: 离子源温度为50 $^{\circ}$ C; 离子喷雾电压为4.5kV; curtain gas设置为30; 离子源气体1设置为55; 离子源气体2设置为55;

[0051] 表1分析物MS/MS参数和保留时间

分析物	Rt (min)	MRM1	MRM2	DP	CE
[0052] 脱氧尿苷	5.11	229.2	113.0	20.0	10.0
¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₂ -脱氧尿苷	5.11	240.0	119.0	20.0	10.0
[0053] 4-氯-DL-氯苯丙氨酸(内标)	6.66	200.0	154.0	40.0	16.0

[0054] ¹³C₉, ¹⁵N₂-脱氧尿苷与脱氧尿苷响应因子的测定;

[0055] S4.1: 45 μ L超纯水分别加入5 μ L不同浓度的¹³C₉, ¹⁵N₂-脱氧尿苷与脱氧尿苷系列工作液配制成终浓度为1、10、100ng/mL的标准样本, 每一浓度水平配制3份;

[0056] S4.2: 然后按照步骤2的方法处理进样, 响应因子(RF) = $A_{\text{真实}}/A_{\text{替代}}$, 其中 $A_{\text{真实}}$ 代表某浓度下脱氧尿苷的峰面积, $A_{\text{替代}}$ 代表同等浓度下¹³C₉, ¹⁵N₂-脱氧尿苷的峰面积, 测定结果如表2。

[0057] 可以看出, RF值在线性范围内为一恒定值且趋近于1, 说明在本发明的测定方法下脱氧尿苷与¹³C₉, ¹⁵N₂-脱氧尿苷与无明显离子化效率的差异;

[0058] 表2响应因子的测定

分析物	浓度 (ng/ml)	RF (平均值)
[0059] ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₂ -脱氧尿苷	1	1.12
	10	1.10
	100	0.90

[0060] 步骤4: 标准曲线的分析;

[0061] 选取若干人体血清样本混匀, 分别取45 μ L的混合血清, 加入5 μ L步骤1中制备的不同浓度的¹³C₉, ¹⁵N₂-脱氧尿苷系列工作液, 配制成终浓度分别为0.3、1、3、10、30、100ng/mL的标准血清样本, 按步骤2中的方法处理进样分析。以所测生物样品中待测物¹³C₉, ¹⁵N₂-脱氧尿苷与IS的峰面积比值为因变量, 待测物的终浓度为自变量, 进行最小二乘法($W=1/x^2$)回归运算, 求得¹³C₉, ¹⁵N₂-脱氧尿苷在人血清中的直线回归方程: $y=0.000305x-$

0.000014 ($r^2=0.9998$)。

[0062] 本实施例中,建立了一种简单、可靠且重复性好的血清中内源性 脱氧尿苷的定量方法,并成功应用于测定正常受试者以及心肌梗死病人血清脱氧尿苷水平,通过数据分析给出血清中脱氧尿苷临界值为 5.15ng/ml,以此进行判断,高于此临界值的诊断准确率达到79%。

[0063] 实施例2

[0064] 本实施例中,血清中脱氧尿苷定量测定方法在心肌梗死诊断中的应用,应用于心肌梗塞的诊断标记物测定。

[0065] 实施例3

[0066] 本实施例中,诊断标记物,为血清中的内源性脱氧尿苷,也可以 扩展为血浆、全血中内源性脱氧尿苷。

[0067] 本实施例中,血清/血浆中脱氧尿苷浓度水平用于诊断心肌梗塞。

[0068] 实施例4

[0069] 本实施例中,心肌梗塞诊断方法,心肌梗塞病人血清/血浆中脱 氧尿苷浓度高于 5.15 μ g/mL,而健康人群脱氧尿苷浓度低于5.15 μ g/mL。

[0070] 实施例5

[0071] 本实施例中,健康受试者以及心肌梗死病人血清中脱氧尿苷的测 定及ROC曲线分析,包括以下步骤:

[0072] 步骤一:临床来源的正常健康受试者和心肌梗死病人血清样品, 37度水浴中放置 10分钟解冻,取50 μ l上述血清样本按步骤1中方法处理进样,根据当日随行血清标准曲线计算每个血清样本中内源性 脱氧尿苷的浓度(图4)。与正常组相比,心肌梗死病人组别血清样 本中内源性脱氧尿苷显著性升高。

[0073] 步骤二:将两组人血清内源性脱氧尿苷的定量结果绘制ROC曲线 (图5),心肌梗死病人组别ROC曲线下面积为0.794,其数据分析 结果如表3。

[0074] 表3正常受试者与MI病人血清中脱氧尿苷定量结果

组别	Mean \pm SD	置信区间		cut off 值	诊断百分比
	ng/ml	95%	90%	ng/ml	%
Health	4.52 \pm 1.05	2.75-6.84	3.34-6.54	\	\
MI	5.98 \pm 1.47	3.93-8.14	4.01-7.53	5.15	79.4

[0076] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范 围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技 术范围内,根据本发明的技术方案 及其发明构思加以等同替换或改 变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

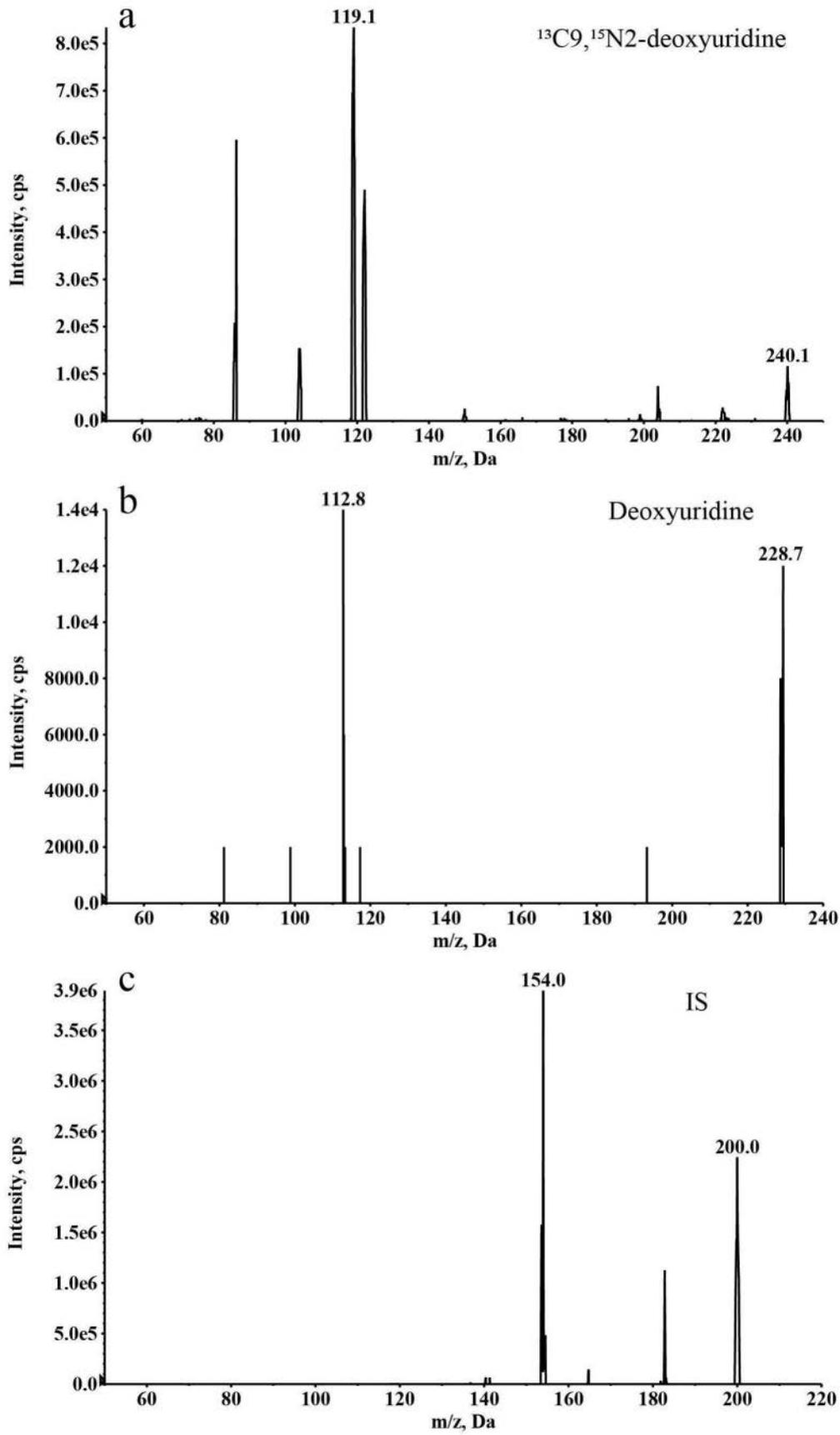


图1

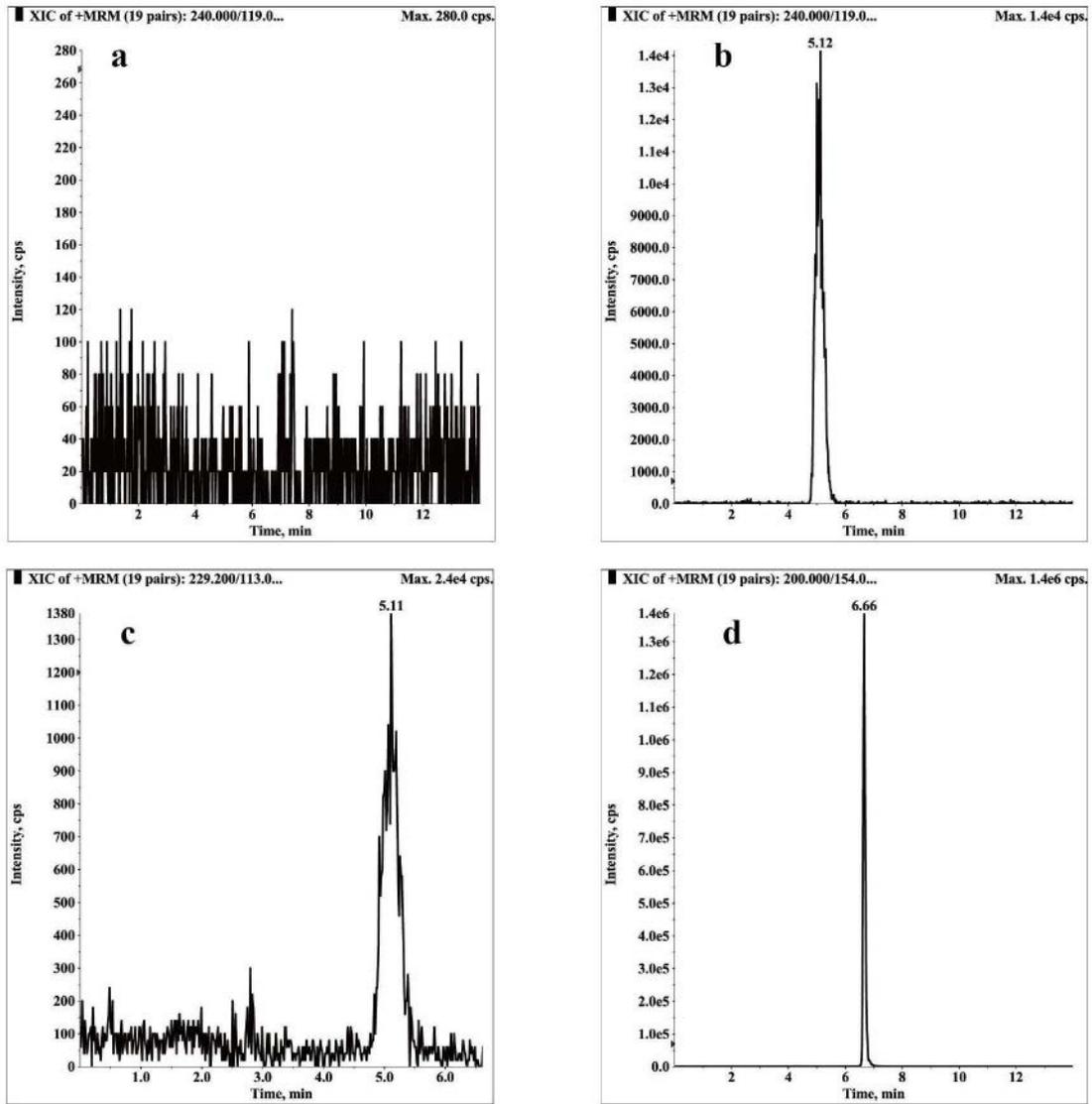


图2

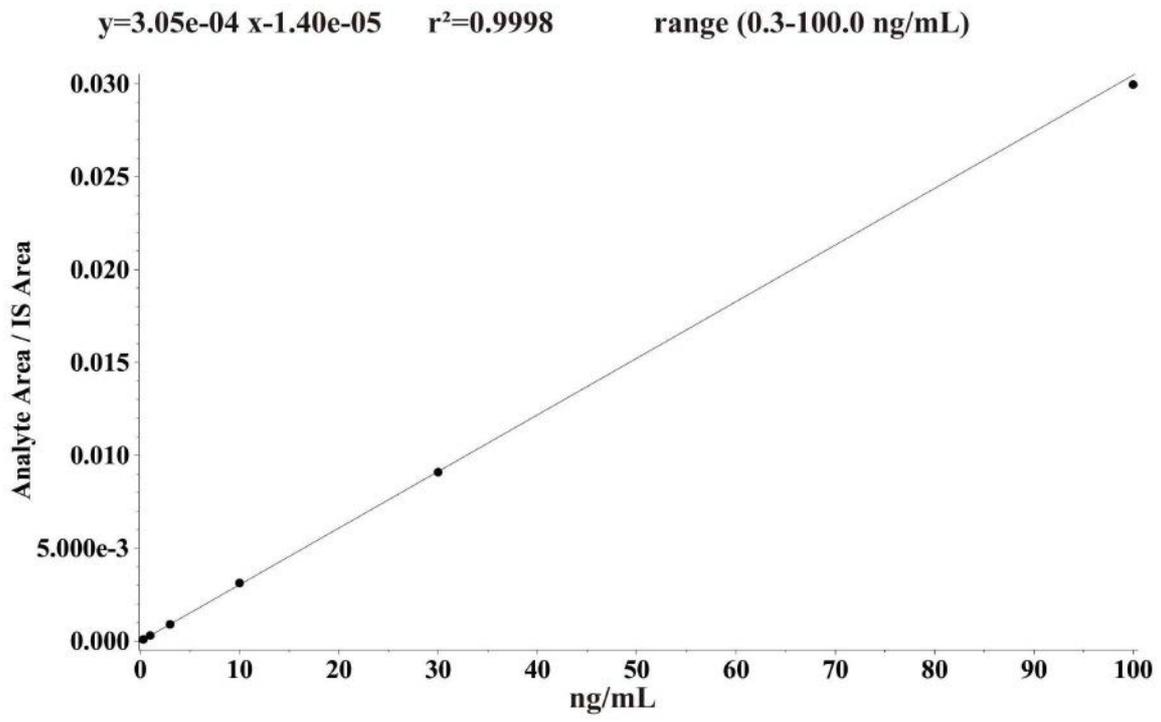


图3

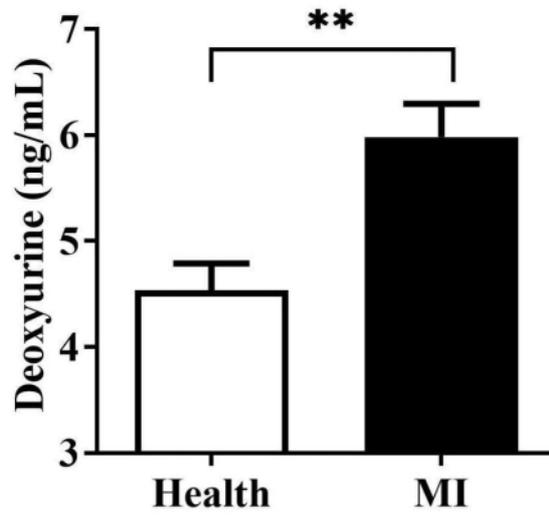


图4

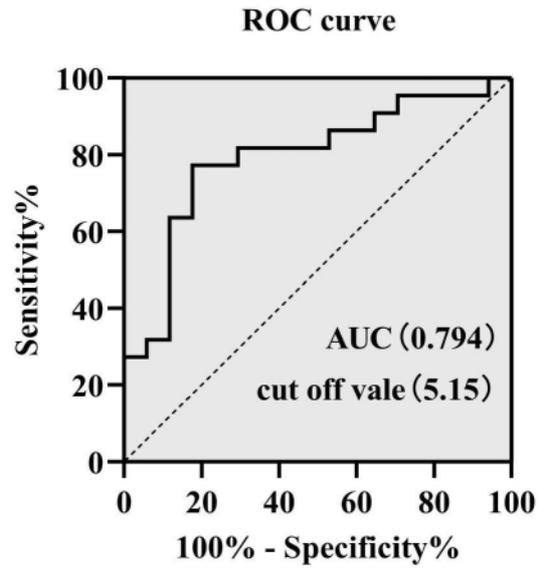


图5