

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96190186.1

[45] 授权公告日 2002 年 5 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1085840C

[22] 申请日 1996.3.15
[21] 申请号 96190186.1
[30] 优先权
[32] 1995.3.16 [33] JP [31] 57307/95
[86] 国际申请 PCT/JP96/00664 1996.3.15
[87] 国际公布 WO96/28734 日 1996.9.19
[85] 进入国家阶段日期 1996.11.18
[73] 专利权人 协和梅迪克斯株式会社
地址 日本东京都
[72] 发明人 宫内一人 三池彰
审查员 王 奕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 段承恩

权利要求书 4 页 说明书 21 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 低密度脂蛋白中胆甾醇的定量法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及低密度脂蛋白(LDL)中的胆甾醇的定量法,其特征是从含有 LDL 的试样中除去高密度脂蛋白中的胆甾醇后,用胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶与其反应,然后定量分析由此而产生的过氧化氢或还原型辅酶。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种低密度脂蛋白中胆甾醇的定量法，其特征在于，从含有低密度脂蛋白的试样中除去高密度脂蛋白中的胆甾醇之后，使胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶与其反应，定量分析由此产生的过氧化氢或还原型辅酶，

在使胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶进行反应时，在其中存在一种能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂，

其中所说的除去高密度脂蛋白中的胆甾醇的方法是在一种能对高密度脂蛋白以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂的存在下，使其与化学修饰或未修饰的胆甾醇酯水解酶或化学修饰或未修饰的胆甾醇氧化酶或化学修饰或未修饰的胆甾醇氧化还原酶反应的方法。

2. 如权利要求 1 所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说能对高密度脂蛋白以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂是由肝素或其盐、磷钨酸或其盐、葡聚糖硫酸或其盐、聚乙二醇、硫酸化环糊精或其盐、硫酸化低聚糖或其盐或它们的混合物，以及二价金属盐所组成。

3. 如权利要求 1 所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说能对高密度脂蛋白以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂是抗载脂蛋白 B 抗体或抗载脂蛋白 C 抗体。

4. 如权利要求 1 中所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中，在化学修饰的胆甾醇酯水解酶、化学修饰的胆甾醇氧化酶或化学修饰的胆甾醇氧化还原酶中的修饰部分是以聚乙二醇为主成分的基团、以聚丙二醇为主成分的基团、具有聚丙二醇与聚乙二醇的共聚物的基团、在结构中含有糖类的基团、磺丙基或聚氨酯基。

5. 如权利要求 1 中所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是非离子型、阳离子型或阴离子型表面活性剂、环糊精类、化学修饰或未修饰

但能与低密度脂蛋白反应的胆甾醇酯水解酶、化学修饰或未修饰但仅能与低密度脂蛋白反应的胆甾醇氧化酶或者化学修饰或未修饰但能与低密度脂蛋白反应的胆甾醇氧化还原酶。

6. 如权利要求 1 中所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是一种能使低密度脂蛋白的胆甾醇反应可能化的胆甾醇酯水解酶。

7. 如权利要求 1 中所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是表面活性剂或螯合剂。

8. 如权利要求 1 中所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说胆甾醇酯水解酶、胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶是由动物、植物或微生物获得的酶，或者将其基因导入别的微生物中而产生的酶，或者是将此基因改变而产生的酶。

9. 如权利要求 1 中所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说对过氧化氢的定量法是通过使过氧化物酶与色素源反应而转变成色素来对过氧化氢进行定量的方法。

10. 低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，在与低密度脂蛋白的反应性低的化学修饰或未修饰的胆甾醇酯水解酶和化学修饰或未修饰的胆甾醇氧化酶或化学修饰或未修饰的胆甾醇氧化还原酶的存在下，从含有低密度脂蛋白的试样中，除去低密度脂蛋白以外的脂蛋白中的胆甾醇后，加入一种能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂，定量产生的过氧化氢或还原型辅酶。

11. 如权利要求 10 所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中，在化学修饰的胆甾醇酯酶中的修饰部分是以聚乙二醇为主成分的基团、以聚丙二醇为主成分的基团、具有聚丙二醇与聚乙二醇的共聚物的基团、在结构中含有糖类的基团、磺丙基或聚氨酯基。

12. 如权利要求 10 所述的低密度脂蛋白中的胆甾醇的定量法，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是一种能使低密度脂蛋白的胆甾醇反应可能化的胆甾醇酯水解酶。

剂盒，其中所说能使低密度脂蛋白中的脂甾醇反应可能化的试剂是非离子型、阳离子型或阴离子型表面活性剂、环糊精类、化学修饰或未修饰但能与低密度脂蛋白反应的胆甾醇酯水解酶、化学修饰或未修饰但仅能与低密度脂蛋白反应的胆甾醇氧化酶或者化学修饰或未修饰但能与低密度脂蛋白反应的胆甾醇氧化还原酶。

22. 如权利要求 17 中所述的对低密度脂蛋白中的胆甾醇定量的试剂盒，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是一种能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的胆甾醇酯水解酶。

23. 如权利要求 17 中所述的对低密度脂蛋白中的胆甾醇定量的试剂盒，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是表面活性剂或螯合剂。

24. 一种对低密度脂蛋白中的胆甾醇定量的试剂盒，由含有与低密度脂蛋白的反应性低的化学修饰或未修饰的胆甾醇酯水解酶和化学修饰或未修饰的胆甾醇氧化酶或化学修饰或未修饰的胆甾醇氧化还原酶的试剂和能够使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂组成。

25. 如权利要求 24 所述的对低密度脂蛋白中的胆甾醇定量的试剂盒，其中，在化学修饰的胆甾醇酯酶中的修饰部分是以聚乙二醇为主成分的基团、以聚丙二醇为主成分的基团、具有聚丙二醇与聚乙二醇的共聚物的基团、在结构中含有糖类的基团、磺丙基或聚氨酯基。

26. 如权利要求 24 中所述的对低密度脂蛋白中的胆甾醇定量的试剂盒，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是一种能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的胆甾醇酯水解酶。

27. 如权利要求 24 中所述的对低密度脂蛋白中的胆甾醇定量的试剂盒，其中所说能使低密度脂蛋白中的胆甾醇反应可能化的试剂是表面活性剂或螯合剂。

低密度脂蛋白中胆甾醇的定量法及其试剂盒

本发明涉及一种在临床诊断领域中对动脉硬化的诊断具有重要意义的低密度脂蛋白 (LDL) 中的胆甾醇 (以下称为 LDL 胆甾醇) 的定量法。

迄今为止, 在进行 LDL 胆甾醇的定量时, 都是首先测定试样中的胆甾醇总量, 然后向另外一个试样中添加 LDL 和极低密度脂蛋白 (VLDL) 的沉淀剂, 离心分离, 测定上清液中高密度脂蛋白 (HDL) 中的胆甾醇 (以下称为 HDL 胆甾醇) 含量, 再根据 Friedewald 的换算式算出其数值 (日本临床 广范围 血液·尿化学检查 免疫学的检查 上卷, 日本临床社 出版, 615 页, 1995 年)。按照该方法, 必须对总胆甾醇含量和 HDL 胆甾醇含量分二次测定, 另外还需进行离心分离操作等, 步骤麻烦。然而, 即使单纯地将血清试样直接添加到含有胆甾醇酯酶和胆甾醇氧化酶的试剂中, 与测定胆甾醇总量的体系没有差别, 对 LDL 胆甾醇没有特异性。

在特开昭 58 - 165800 中公开了一种在特殊的表面活性剂的存在下, 不需分离操作即可直接测定 LDL 胆甾醇含量的方法。然而, 按照该方法, 在 LDL 胆甾醇发生反应的同时, HDL 胆甾醇也发生反应, LDL 的特异性低, 而且, 该反应条件的设定麻烦, 难以适用于多种多样的试样。

另外, 在特开平 7 - 280812 中公开了这样一种方法, 该方法是先使 LDL 凝聚, 然后除去 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇, 再将已凝聚的 LDL 进行解凝聚, 通过使 LDL 胆甾醇进行酶反应来测定 LDL 胆甾醇的含量。

本发明者们研究出下述 a)、b) 两种方法, 从而完成了本发明, 其中:
a) 在一种能阻断 HDL 以外的脂蛋白即 LDL、VLDL 和乳糜微粒 (CM) 反应的试剂的存在下, 使用一种胆甾醇反应试剂与 HDL 胆甾醇

进行特异反应而将其除去，然后根据需要，在一种可使与 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂的存在下，用一种胆甾醇反应试剂，使胆甾醇进行定量的酶反应，这样不需特地进行分离即能特异地定量含有 LDL 的试样中的 LDL 胆甾醇； b) 仅仅对 LDL 进行反应阻断，在用一种胆甾醇反应试剂将 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇通过反应除去后，再用一种胆甾醇反应试剂使胆甾醇进行定量的酶反应，这样不需特地进行分离即能特异地定量含有 LDL 的试样中的 LDL 胆甾醇。

此处，所谓对 HDL 以外的脂蛋白进行反应阻断是指，使 HDL 以外的脂蛋白凝聚，或者使 HDL 以外的脂蛋白外壁的反应性减弱，从而仅仅使这些脂蛋白的外壁选择性地不被破坏，这样就可使 HDL 中的胆甾醇成为能选择性地酶反应的状态。另外，所谓将 LDL 胆甾醇反应可能化是指，通过使 LDL 的外壁破坏来使 LDL 胆甾醇成为能够进行酶反应的状态。另外，所谓仅仅对 LDL 进行反应阻断是指，相反地使 LDL 凝聚或者使 LDL 的外壁的反应性减弱，从而使得仅仅是 LDL 的外壁选择性地不被破坏，这样就可使 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇成为能够选择性地酶反应的状态。

本发明涉及一种 LDL 胆甾醇的定量法，其特征在于，从含有 LDL 的试样中除去 HDL 胆甾醇，然后根据需要，在一种可使 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂的存在下，使其与胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶反应，然后定量由此产生的过氧化氢或还原型辅酶。

另外，根据本发明，可以提供一种用于 LDL 中的胆甾醇定量的试剂，该试剂以能够对 HDL 以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂和能使 LDL 中的胆甾醇反应可能化的试剂作为组成成分，或者可以提供一种用于 LDL 中的胆甾醇定量的试剂，该试剂由能够对 HDL 以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂和能使 LDL 中的胆甾醇反应可能化的试剂组合而成。

另外，根据本发明，还可以提供一种以仅仅对 LDL 进行反应阻断的试剂作为成分的用于 LDL 中的胆甾醇定量的试剂，一种以仅仅对 LDL 进行反应阻断的试剂和可使 LDL 中的胆甾醇反应可能化的试剂作为成分的用于 LDL 中的胆甾醇定量的试剂，或者一种由仅仅对 LDL 进行反应阻断的试剂与可使 LDL 中的胆甾醇反应可能化的试剂组合而成的用于

LDL 中的胆甾醇定量的试剂。

作为上述定量法之一，可以举出：在一种能对 HDL 以外的脂蛋白，即 LDL、VLDL 和 CM 进行反应阻断的试剂的存在下，用一种胆甾醇反应试剂使 HDL 胆甾醇发生特异反应而将其除去后，根据需要，在一种可使 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂的存在下，使其与胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶反应，然后定量分析所产生的过氧化氢或还原型辅酶的方法；另外，作为另一种方法，可以举出：在一种仅仅对 LDL 进行反应阻断的试剂的存在下，用一种胆甾醇反应试剂将 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇除去之后，使其与胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶反应，然后定量分析由此产生的过氧化氢或还原型辅酶的方法。

例如，在一种能对 HDL 以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂的存在下，使含有 HDL 和 LDL 的试样与胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶反应而生成过氧化氢，在此之后或者同时，向其中加入过氧化氢酶、过氧化物酶与苯胺化合物、过氧化物酶与苯酚化合物或者过氧化物酶与 4 - 氨基安替比林，以除去过氧化氢，然后加入色素源（在使用过氧化氢酶的情况下也添加过氧化物酶）和适当的表面活性剂、环糊精类、或者能与 LDL 作用的胆甾醇酯水解酶以使其发色，从而能对 LDL 胆甾醇进行定量。此处，所谓能与 LDL 作用是指，通过破坏已被阻断反应的 LDL 的外壁，使 LDL 胆甾醇成为能进行酶反应的状态。

另外，在一种仅对 LDL 进行反应阻断的试剂的存在下，向含有 LDL 的试样中加入胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶和色素源以使其发色，这时，通过测定在 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇发生反应之后的吸光度的变化，即可以对 LDL 胆甾醇进行定量。

另外，在一种仅对 LDL 进行反应阻断的试剂（在下述的胆甾醇酯水解酶能仅对 LDL 进行反应阻断的情况下则不需要）的存在下，使含有 LDL 的试样与胆甾醇酯水解酶和胆甾醇氧化酶作用而生成过氧化氢，在此之后或同时，向其中加入过氧化氢酶、过氧化物酶与苯胺化合物、过氧化物酶与苯酚化合物或者过氧化物酶与 4 - 氨基安替比林，以除去过氧化氢，然后向其中加入色素源（在使用过氧化氢酶的场所也添加过氧

化物酶)和能使 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂(在下述的胆甾醇酯水解酶能使 LDL 胆甾醇反应可能化的情况下则不需要)、胆甾醇水解酶(由于在最初加入的胆甾醇酯水解酶是能使 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂,因此在能够与 LDL 胆甾醇反应的情况下就不需要)以使其发色,这时即可对 LDL 胆甾醇进行定量。

本发明的方法适用于血液、尿等含有 LDL 的体液。

下面对本发明的定量法举例进行说明。

例 1

①向规定量的试样中加入一种含有能对 HDL 以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂的中性附近的缓冲液,例如在 37℃ 下加温数分钟以使 LDL、VLDL 和 CM 发后反应阻断;②向其中加入一种与 LDL 没有反应性的胆甾醇酯水解酶(优选是经化学修饰的胆甾醇酯水解酶)、一种与 LDL 没有反应性的胆甾醇氧化酶(优选是经化学修饰的胆甾醇氧化酶)[或者胆甾醇氧化还原酶(优选是经化学修饰的胆甾醇氧化还原酶)]以及过氧化氢酶、过氧化物酶与苯胺化合物、过氧化物酶与苯酚化合物或过氧化物酶与 4-氨基安替比林[或 NAD(P)] ,以使 HDL 胆甾醇反应而将其除去;③加入表面活性剂、环糊精类、螯合剂、能与 LDL 反应的胆甾醇酯水解酶(优选是未经化学修饰的胆甾醇酯水解酶)、能与 LDL 反应的胆甾醇氧化酶(优选是未经化学修饰的胆甾醇氧化酶)或能与 LDL 反应的胆甾醇氧化还原酶(优选是未经化学修饰的胆甾醇氧化还原酶)和色素源[在使用胆甾醇氧化还原酶的情况下不添加,或者添加 NAD(P)] 并将 LDL 胆甾醇导入过氧化氢中,从而使其发色[或者导入 NAD(P) 中];④用分光光度计测定在生成的色素的最大波长处的吸光度[在使用胆甾醇氧化还原酶的情况下,通过测定在 300 ~ 500nm 处,优选在 330 ~ 400nm 处,例如在 340nm 处的吸光度来测定 NAD(P)H 的增加值(也可以加入心肌黄酶、双偶氮盐来使甲脒色素发色,通过比色来定量甲脒色素)]。此处,所谓与 LDL 没有反应性是指 LDL 的外壁没有被破坏,以致于未能使 LDL 胆甾醇成为能够进行酶反应的状态。LDL 胆甾醇的含量可以通过与另外在相同条件下使用含有已知浓度的 LDL 胆甾醇的标准液进行测定时的吸光度进行比较而算出。

应予说明，步骤①和②可以同时进行。

作为能对 HDL 以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂的一个例子，可以举出凝聚剂和二价金属盐的组合。作为凝聚剂，可以举出：肝素或其盐、磷钨酸或其盐、葡聚糖硫酸或其盐、聚乙二醇、硫酸化环糊精或其盐、硫酸化低聚糖或其盐，或它们的混合物等；作为环糊精，可以举出： α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精等；作为低聚糖，可以举出：麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖等；作为盐，可以举出：钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、镁盐等。作为二价金属盐，可以举出：镁盐、钙盐、锰盐、镍盐、钴盐等。

作为凝聚剂，优选是使用 0.02~10mM 的分子量为 5000 ~ 20000 的肝素或其盐、0.1~10mM 的分子量为 4000 ~ 8000 的磷钨酸或其盐、0.01~5mM 的分子量为 10000 ~ 500000 的葡聚糖硫酸或其盐、0.1~20mM 的分子量为 1000 ~ 10000 的葡聚糖硫酸或其盐、0.3~100mM 的分子量为 4000 ~ 25000 的聚乙二醇 (PEG)、0.1~50mM 的分子量为 1000 ~ 3000 的硫酸化环糊精或其盐、0.1 ~ 50mM 的分子量为 400 ~ 3000 的硫酸化低聚糖或其盐，或它们的混合物等。更优选是使用 0.03~1mM 的分子量为 14000 ~ 16000 的肝素或其盐、0.1~3mM 的分子量为 5000 ~ 7000 的磷钨酸或其盐、0.01~5mM 的分子量为 150000 ~ 250000 的葡聚糖硫酸或其盐、0.1 ~ 10mM 的分子量为 1000 ~ 5000 的葡聚糖硫酸或其盐、1.0~50mM 的分子量为 5000 ~ 22000 的 PEG、0.1 ~ 10mM 的分子量为 1000 ~ 2000 的硫酸化环糊精或其盐、0.1~10mM 分子量为 400 ~ 2000 的硫酸低聚糖或其盐，或它们的混合物等。

作为二价的金属盐，可以举出 0.1~50mM 的镁盐、钙盐、锰盐、镍盐、钴盐等，优选是使用 0.1~50mM 的镁盐。

作为能对 HDL 以外的脂蛋白进行反应阻断的试剂，也可以使用抗载脂蛋白 (APO) B 抗体、抗载脂蛋白 C 抗体等，作为抗载脂蛋白 B 抗体、抗载脂蛋白 C 抗体，可以举出通过用人血清精制的载脂蛋白 B 或载脂蛋白 C 在家兔体内免疫而获得抗载脂蛋白 B 抗体血清或抗载脂蛋白 C 抗体血清，进行硫酸铵沉淀、盐析而获得 IgG 部分，或者用上述的载

脂蛋白 B 或载脂蛋白 C 在小鼠体内免疫而获得抗载脂蛋白 B 单克隆抗体、抗载脂蛋白 C 单克隆抗体（实验操作入门，安东民卫著，讲谈社サイエンスフィク，21 页，1991 年）等。

作为酶，可以举出：通常市售的，由那些具有能使脂甾醇水解的能力的动物、植物或微生物得来的胆甾醇酯酶或脂蛋白脂肪酶，由那些能通过使胆甾醇氧化而生成过氧化氢的动物、植物或微生物得来的胆甾醇氧化酶，由动物、植物或微生物得来的胆甾醇脱氢酶等。为了提高这些酶的特异性、稳定性，也可以使用以聚乙二醇为主成分的基团、以聚丙二醇为主成分的基团、在水溶性低聚糖残基等结构中含有糖类的基团、磺丙基、聚氨酯基等对上述的酶进行化学修饰而获得的酶。另外，按照基因操作获取这些基因，将其导入别的微生物中而产生的酶，或者对这些酶进行化学修饰而获得的修饰体，或者通过改变这些基因而产生的酶或者对这些酶进行化学修饰而获得的修饰体等也可以适用。

作为用于修饰酶的试剂（化学修饰剂），例如可以举出：由一种能够与氨基键合的基团键合到聚乙二醇上而生成的化合物{由 N-羟基琥珀酰亚胺基等可以与氨基键合的基团键合到聚乙二醇上而生成的 Sunbright VFM4101〔日本油脂（株）制〕等}、具有聚亚烷基二醇结构和酸酐结构的 Sunbright AKM 系列、同样的 ADM 系列、同样的 ACM 系列〔每一种都为日本油脂（株）制：化学工学论文集，第 20 卷，第 3 号，459 页，1994 年〕、由一种可以与氨基键合的基团键合到聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物上而生成的化合物、聚乙二醇单甲基丙烯酸单甲醚与马来酸酐的共聚物等。另外，作为聚氨酯化学修饰剂的聚氨酯 P4000 activated（バーリンガー・マンハイム 社制 Enzyme modification set 能书）、作为葡聚糖修饰剂的葡聚糖 T40，TCT-activated（同）、1, 3-丙烷磺内酯等也可以使用。通过这些化学修饰剂就可以使用以聚乙二醇为主成分的基团、以聚丙二醇为主成分的基团、含有聚丙二醇与聚乙二醇的共聚物的基团、在结构中含有糖类的基团、磺丙基、聚氨酯基等来修饰酶。

下面例示用上述化学修饰剂与酶进行反应的方法，但并不受这些方法的限制。首先将酶溶解于一种 pH8 以上的 HEPES 缓冲液等的缓冲液

中，在 0 ~ 50 ℃ 下添加例如 0.01~500 倍摩尔量的 Sunbright，搅拌 5 ~ 60 分钟。该反应液可以直接使用，或者根据需要，通过限外过滤膜除去低分子物后使用。至于胆甾醇酯水解酶、胆甾醇氧化酶和胆甾醇氧化还原酶的用量，优选使用 0.1~100 μ /ml。

作为与 LDL 没有反应性的胆甾醇酯水解酶、胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶，优选是通过一些以聚乙二醇为主成分的基团、以聚丙二醇为主成分的基团、在水溶性低聚糖残基等结构中含有糖类的基团、磺丙基、聚氨酯基等对胆甾醇酯水解酶、胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶进行化学修饰而生成的酶。

作为可与 LDL 发生反应的胆甾醇酯水解酶、胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原剂，优选是未修饰的胆甾醇酯水解酶、胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶，但是一些为了使上述酶稳定化而进行了若干修饰后所生成的酶也可以在仅仅能对 LDL 发生反应的范围内使用。作为修饰剂，可以举出上述的 Sunbright VFM4101〔日本油脂（株）制〕等。作为酶的使用量，优选为 0.5~100 μ /ml。

作为为了获得与 LDL 的反应性而使用的表面活性剂，可以举出：

トリトン X-100 等非离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂或阴离子型表面活性剂，其用量可在 0.02~10 % 的范围内。另外，作为为了获得与 LDL 的反应性而使用的环糊精类，可以举出： α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精、二甲基- α -环糊精、二甲基- β -环糊精、二甲基- γ -环糊精、羟丙基- α -环糊精、羟丙基- β -环糊精、羟丙基- γ -环糊精、2, 3, 6-O-甲基- β -环糊精、聚- β -环糊精等，其用量可在 0.1~10 % 的范围内。另外，作为为了获得与 LDL 的反应性而使用的螯合剂，优选是使用那些能与镁形成配合物的化合物，具体地可以举出：乙二胺四乙酸（EDTA）类、三乙撑四胺-N, N, N', N'', N''', N'''-六乙酸（TTHA）、反式 1, 2-环己烷二胺-N, N, N', N'-四乙酸（CYDTA）-水合物等，其用量可在 0.005~2% 的范围内。作为成为能够检测出过氧化氢的胆甾醇氧化酶的基质的色素源，一般可以使用的有：4-氨基安替比林与诸如苯酚、4-氯苯酚、间甲酚、3-羟基-2, 4, 6-三碘苯甲酸（HTIB）等的苯酚类的组合物，此外，4

- 氨基安替比林可与已知作为 Trinder 试剂 (同仁化学研究所第 19 版总合 catalog, 1994) 的 N-磺丙基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)间甲苯胺 (TOOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3, 5-二甲基苯胺 (MAOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3, 5-二甲氧基苯胺 (DAOS)、N-乙基-N-磺丙基间甲苯胺 (TOPS)、N-(2-羟基-3-磺丙基)-3, 5-二甲氧基苯胺 (HDAOS)、N, N-二甲基间甲苯胺、N, N-二磺丙基-3, 5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-磺丙基间甲氧基苯胺、N-乙基-N-磺丙基苯胺、N-乙基-N-磺丙基-3, 5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-磺丙基-3, 5-二甲基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)间甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3, 5-二甲氧基苯胺等的苯胺类或者 N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰基亚乙基二胺 (EMSE)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙酰基亚乙基二胺等组合使用。另外, 作为高灵敏度的色素源, 也可以使用在特公昭 60-33479 中记载的 10-(N-甲基氨基甲酰基)-3, 7-双(二甲基氨基)吩噻嗪 (MCDP)、在特公平 4-27839 中记载的双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基]胺 (BCMA)、特开昭 62-296 中记载的色素源等, 另外, 这些色素源也可以与 4-氨基安替比林或上述的 Trinder 试剂组合使用。作为色素源的浓度, 优选为 0.01~10mg/ml, 这要受溶解度关系的限制。

另外, 在除去 HDL 时, 作为可与过氧化物酶一起使用的苯酚化合物和苯胺化合物, 上述的苯酚类和苯胺类也同样地可以使用。

作为缓冲剂, 除了磷酸盐之外三羟甲基甲烷缓冲液, Good's 缓冲液等也适合使用, 作为其浓度, 优选为 5~500mM。其 PH 值以 5~9 范围内为宜。

例 2

① 将试样加入一种含有抗坏血酸氧化酶的缓冲液中, 再向其中添加一种含有与 LDL 的反应性低的 (也就是仅仅对 LDL 发生反应阻断的)

胆甾醇酯水解酶、与 LDL 的反应性低的胆甾醇氧化酶（或者与 LDL 的反应性低的胆甾醇氧化还原酶）以及过氧化物酶和色素源〔或 NAD（P）〕的试剂。②因为 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇的反应首先结束，所以用分光光度计测定其后的吸光度的变化，与另外在同样条件下使用含有已知浓度的 LDL 胆甾醇的标准液测定时所获得的吸光度变化进行比较，从而算出 LDL 胆甾醇的含量。

作为与 LDL 的反应性低的胆甾醇酯水解酶，优选是经化学修饰的胆甾醇酯水解酶，作为与 LDL 的反应性低的胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶，经过化学修饰的或未修饰的胆甾醇氧化酶或者经过化学修饰的或未修饰的胆甾醇氧化还原酶都可以使用。作为修饰剂，可以举出上述的 Sunbright VFM4101〔日本油脂（株）制〕等。作为酶的使用量，优选为 0.5~100 μ /ml。

作为色素源和缓冲剂，同样地可以使用在例 1 中记载的色素源和缓冲剂。

例 3

①将试样加入一种含有仅对 LDL 进行反应阻断的试剂（在下述的胆甾醇酯水解酶仅对 LDL 进行反应阻断的情况下不需要）、胆甾醇酯水解酶、胆甾醇氧化酶（或胆甾醇氧化还原酶）以及过氧化物酶、过氧化物酶与苯胺化合物、过氧化物酶与苯酚化合物或过氧化物酶与 4 - 氨基安替比林〔或 NAD（P）〕的缓冲液中，使 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇发生反应而被除去；②加入一种能使 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂（在下述的胆甾醇酯水解酶能使 LDL 胆甾醇反应可能化的情况下不需要）、胆甾醇酯水解酶（由于最初加入的胆甾醇酯水解酶是一种能使 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂，因此在与 LDL 胆甾醇仍有反应可能的情况下不需要）和色素源〔或者不添加，或添加 NAD（P）〕（在使用过氧化物酶的情况下也添加过氧化物酶，并将 LDL 胆甾醇导入过氧化氢中而使其发色〔或者导入 NAD（P）H 中〕；③用分光光度计测定所生成的色素在最大波长处的吸光度〔在使用胆甾醇氧化还原酶的情况下，以 300 ~ 500nm 处，优选 330 ~ 400nm 处，例如 340nm 处的吸光度来测定 NAD（P）H 的增加值（也可以加入心肌黄酶、双偶氮盐来使甲脒色素发色，

通过比色来定量甲脎色素)]。LDL 胆甾醇的含量, 可以通过与另外在相同条件下使用含有已知浓度的 LDL 胆甾醇的标准液测定时获得的吸光度进行比较而算出。

作为仅对 LDL 有反应阻断作用的试剂, 可以举出仅对 LDL 有反应阻断作用的胆甾醇酯水解酶等, 作为能使 LDL 胆甾醇反应可能化的试剂, 可以举出: 能使 LDL 胆甾醇反应可能化的胆甾醇水解酶、表面活性剂、螯合剂等。

作为表面活性剂和螯合剂, 同样地可以使用在例 1 中记载的表面活性剂和螯合剂。

作为酶, 可以举出在例 1 中记载的酶。

作为仅对 LDL 有反应阻断作用的胆甾醇酯水解酶, 优选是通过向那些由动物、植物或微生物得来的胆甾醇酯水解酶中加入 10 倍以上摩尔比的化学修饰剂而制成的胆甾醇酯水解酶, 除此之外, 优选是那些由动物、植物或微生物得来的胆甾醇酯水解酶并具有同样特异性的酶, 或者是通过改变其遗传因子而发现的具有同样特异性的酶。具体地可以举出, 向一种由假单细胞或色杆菌等微生物得来的胆甾醇酯酶的水溶液中加入 10 倍以上摩尔比的在例 1 中记载的化学修饰剂以使其反应而生成的酶等。作为化学修饰剂的摩尔比, 优选为 10 ~ 500 倍, 这要根据出现特异性的效果与由于修饰而引起的活性降低来决定。另外, 作为未经化学修饰的胆甾醇酯水解酶, 也可以使用通过以下方法获得的酶, 例如使一些由短杆菌得来的脂肪酶的基因序列的一部分发生无规变化, 再将其导入另外的微生物中, 例如大肠杆菌中而发现并生产出具有酶活性而且仅仅对 LDL 具有反应阻断作用的胆甾醇酯酶, 然后再从其中筛选并进行大量培养和生产而获得的酶。胆甾醇水解酶的用量优选为 0.1~100 μ /ml。另外, 为了提高上述的特异性, 可以在①的阶段中, 在不导致 LDL 凝聚的范围内添加: 肝素、磷钨酸、葡聚糖硫酸、硫酸化环糊精、硫酸化低聚糖或它们的盐, 或者将聚乙二醇与镁盐、钙盐、锰盐、镍盐、钴盐等二价金属盐一起添加。作为环糊精、低聚糖及它们的盐, 可以举出在例 1 中记载的环糊精、低聚糖和它们的盐。

作为能使 LDL 胆甾醇反应可能化的胆甾醇酯水解酶, 优选是未修饰

的胆甾醇酯酶，其用量优选为 0.5~100 μ /ml。

作为胆甾醇氧化酶或胆甾醇氧化还原酶，优选是使用由那些可以通过氧化胆甾醇而生成过氧化氢的微生物获得的胆甾醇氧化酶、由动物或微生物得来的胆甾醇脱氢酶，但是为了提高这些酶的特异性和稳定性，也可以利用那些以聚乙二醇为主成分的基团或水溶性的低聚糖残基等对上述的酶进行化学修饰。在此情况下的化学修饰剂的摩尔比，优选为 0.1~500 倍，这要根据稳定化效果和由于修饰而引起的活性降低来决定。胆甾醇氧化酶和胆甾醇氧化还原酶的使用量优选为 0.1~100 μ /ml。

下面举例示出使上述化学修饰剂与酶反应的方法，但并不受这些方法的制约。首先将酶溶解于 PH8 以上的 HEPES 缓冲液等的缓冲液中，在 0 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 下添加例如规定倍数摩尔量的 Sunbright，搅拌 1 ~ 24 小时。将此反应液直接地使用或者根据需要用限外过滤膜除去低分子物后使用。

在除去 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇时，作为与过氧化物酶一起使用的苯酚化合物和苯胺化合物，同样地可以使用上述的苯酚类和苯胺类，作为色素源和缓冲剂，同样地可以使用上述的色素源和缓冲剂。

因为上述本发明的各种体系一般都含有用于测定胆甾醇的体系，所以也可以使用为了更好地使胆甾醇氧化酶活性化而使用的表面活性剂或胆酸类，另外，也可以使用为了使球蛋白等蛋白可溶化的各种盐类。作为表面活性剂，可以使用浓度在 0 ~ 1 % 范围内的非离子型、阴离子型、阳离子型表面活性剂；作为胆酸类，可以使用浓度在 0 ~ 5 % 范围内的胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸、鹅去氧胆酸等；作为盐类，可以使用浓度在 0 ~ 100mM 范围内的氯化钠、硫酸钠、氯化钾、硫酸钾、氯化镁、硫酸镁、乙酸镁、硝酸镁、氯化锂、硫酸银、氯化铵、硫酸铵、氯化钙、硝酸钙、乙酸钙、氯化镍、硝酸镍、乙酸镍、氯化钴、硝酸钴等。

对附图的简单说明

图 1 表示含有 LDL 胆甾醇 228.4mg/dl 血清的稀释倍率与按实施例 1 的方法测得的吸光度的相关关系。

图 2 表示使用以超离心法分离获得的 HDL、LDL、VLDL 以及人血清，按照实施例 9 的方法用日立 7250 自动分析仪测得的吸光度与时间

过程的关系。

图 3 表示含有 LDL 胆甾醇 228.4mg/dl 血清的稀释倍率与按实施例 11 的方法测得的吸光度的相关关系。

用于实施本发明的最佳方案

实施例 1 LDL 胆甾醇的定量

(1) 酶的化学修饰

把由假单胞菌得来的胆甾醇酯酶 1g 溶解于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH=8) 100ml 中, 冷却至 5℃ 后, 向其中加入 Sunbright VFM4101 [日本油脂(株)制] 15g, 反应 4 小时。将该反应液 (PEG 部分的分子量 = 6000) 直接作为试剂 B 的 PEG 修饰胆甾醇酯酶使用。另外, 使用由短杆菌得来的胆甾醇氧化物酶 1g 和 Sunbright VFM4101, 0.1g 进行与上述同样的反应。直接使用该反应液 (PEG 部分的分子量 = 6000) 作为试剂 B 的 PEG 修饰胆甾醇氧化物酶。

(2) LDL 胆甾醇的定量

试剂 A 3-吗啉代丙烷

磺酸 (MOPS) 缓冲剂	20mM(pH=7)
葡聚糖硫酸	0.7g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5g/l
叠氮化钠	0.1g/l
抗坏血酸氧化酶	3 μ/ml

试剂 B MOPS 缓冲剂

过氧化物酶	20mM(pH=7)
PEG 修饰的胆甾醇酯酶	30 μ/ml
PEG 修饰的胆甾醇氧化物酶	1 μ/ml
胆酸钠	3 μ/ml
EMSE	5g/l
	0.3g/l

试剂 C MOPS 缓冲剂

未修饰的胆甾醇酯酶	20mM(pH=7)
4-氨基安替比林	2 μ ml
	0.4g/l

把含有 LDL 胆甾醇 228.4mg/dl 的血清, ① 直接地; ② 用生理

食盐水稀释为 8/10；③同样地稀释为 6/10；④同样地稀释为 4/10；⑤同样地稀释为 2/10；以及⑥只使用生理食盐水，将它们分别地作为试样进行如下操作。

将试样 20 μ l 添加到试剂 A 2.25ml 中，在 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟，然后添加试剂 B 0.75ml，在 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟，以除去 HDL 胆甾醇，这时，测定试样在 555nm 处的吸光度（ E_1 ）。然后，添加试剂 C 0.75ml，在 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟后，测定试样在波长 555nm 处的吸光度（ E_2 ）。LDL 胆甾醇的浓度是通过使用一种胆甾醇浓度已知为 200mg/dl 的标准液进行同样的操作，再通过将其与（ $E_2 - E_1$ ） $\times$ 稀释倍率所获的数值进行比较而算出。其中，所谓稀释倍率是指（试剂 A + 试剂 B）/（试剂 A + 试剂 B + 试剂 C）的体积比。

使用含有 LDL 胆甾醇 228.4mg/dl 的血清获得的结果示于图 1 中。

实施例 2

使用在实施例 1 的②中记载的试剂 B 和试剂 C，把在试剂 A 中使用的凝聚剂和二价金属盐改变为下述各种组合物，使用日立 7070 自动分析仪（条件为：试样 4 μ l、试剂 A，270 μ l、试剂 B，90 μ l、试剂 C，90 μ l）分别测定各个血清试样。另一方面，使用日立 RPL 42T 旋转器，按照“医学杂志”，第 94 卷（第 8 号），359 页，1975 年”中记载的方法（超离心法）定量分析 LDL 胆甾醇。其结果如表 1 所示，每一个结果都和用超离心法获得的数值非常一致。

甲

磷钨酸	10mg/ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5 mg/ml

乙

葡聚糖硫酸钠（MW = 4000）	1 mg/ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/ml

丙

肝素钠	10 mg/ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mg/ml
丁	
PEG 20000	50 mg/ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5 mg/ml
戊	
磷钨酸	10 mg/ml
葡聚糖硫酸钠 (MW=200000)	7.5 mg/ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5 mg/ml
己	
磷钨酸	10 mg/ml
肝素钠	7.5 mg/ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5 mg/ml
庚	
磷钨酸	10 mg/ml
PEG 6000	7.5 mg/ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5 mg/ml

表 1

试剂 A	测定值
甲	177.7mg/dl
乙	178.9 mg/dl
丙	178.1 mg/dl
丁	177.2 mg/dl
戊	179.0 mg/dl
己	178.8 mg/dl
庚	176.5 mg/dl
超离心法	178.4 mg/dl

实施例 3

使用 Sunbright AKM1511 [日本油脂 (株) 制] 、 聚氨酯 P4000activated (ベーリンガー・マンハイム 社制) 或葡聚糖 T40 , TCT

- activated (ベーリンガー・マンハイム社制) 代替 Sunbright VFM4101, 与实施例 1 的 (1) 同样地对酶进行化学修饰。使用实施例 1 的 (2) 中记载的试剂 A 和试剂 C, 使用上述获得的化学修饰酵素代替试剂 B 中的 PEG 修饰胆甾醇酯酶和 PEG 修饰胆甾醇氧化酶, 与实施例 2 同样地测定在实施例 2 中使用的血清试样。其结果分别为 178.0 mg/dl、179.1 mg/dl、179.8 mg/dl, 这些结果皆与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 4

使用实施例 1 的 ② 中记载的试剂 A, 使用浓度为 300 μ /ml 的过氧化氢酶代替试剂 B 中的过氧化物酶, 使用在试剂 C 中加有 30 μ /ml 的过氧化物酶作为试剂 C, 与实施例 2 同样地测定在实施例 2 中使用的血清试样。其结果为 178.6 mg/dl, 该数值与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 5

使用在实施例 1 的 (2) 中记载的试剂 A 和试剂 C, 使用相同浓度的 TOOS(测定波长 555nm)、DAOS(测定波长 593nm)、MAOS(测定波长 630nm) 或 TOPS(测定波长 550nm) 代替试剂 B 中的 EMSE, 与实施例 2 同样地测定在实施例 2 中使用的血清试样。其结果分别为 177.9 mg/dl、177.8 mg/dl、179.2 mg/dl、178.8 mg/dl, 这些数值与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 6

使用实施例 1 的 (2) 中记载的试剂 A 和试剂 B, 使用浓度为 0.1 mg/ml 的 MCDP(测定波长 666nm) 或 BCMA(测定波长 755nm) 代替试剂 C 中的 4-氨基安替比林, 与实施例 2 同样地测定在实施例 2 中使用的血清试样。获得结果分别为 178.3 mg/dl、179.0 mg/dl, 这些数值与按超离心法所获的数值很一致。

实施例 7

使用在实施例 1 的 (2) 中记载的试剂 A 和试剂 B, 使用浓度为 20mg/ml 的二甲基- β -环糊精代替试剂 C 中的未修饰胆甾醇酯酶, 与实施例 2 同样地测定在实施例 2 中使用的血清试样。其

结果为 177.4 mg/dl，该数值与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 8

把在实施例 1 的 (2) 中记载的试剂 A 和试剂 B 按 3: 1 的比例混合并将其作为试剂 D，向该溶液 3ml 中加入在实施例 2 中使用的血清试样 20 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟，这时测定该试样在 555nm 处的吸光度 (E₁)。接着，加入试剂 C 0.75ml，在 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟后测定该试样在波长 555nm 处的吸光度 (E₂)。使用胆甾醇浓度已知为 200mg/dl 的标准液进行同样的操作，通过与 (E₂ - E₁) $\times$ 稀释倍率所获数值进行比较而算出 LDL 胆甾醇的浓度。其中，所谓稀释倍率是指 (试剂 D) / (试剂 D + 试剂 C) 的体积比。其结果为 177.6 mg/dl，该数值与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 9

试剂 A	MOPS 缓冲剂	10mM(pH=7)
	硫酸钠	2mg/ml
	EMSE	0.3mg/ml
	抗坏血酸氧化酶	3 μ /ml
试剂 B	MOPS 缓冲剂	10mM(pH=7)
	4 - 氨基安替比林	0.5mg/ml
	胆酸钠	3mg/ml
	PEG 修饰的胆甾醇酯酶	5 μ /ml
	未修饰的胆甾醇氧化酶	7 μ /ml
	过氧化物酶	10 μ /ml

作为 PEG 修饰的胆甾醇酯酶，使用与实施例 1 同样的酶。

使用上述的试剂，使用日立 7250 自动分析仪测定在实施例 2 中使用的血清试样。测定在添加试剂 B 后 3.5 分钟至 5 分钟之间的吸光度变化 (E₃)。使用一种胆甾醇浓度为 200mg/dl 的标准液进行同样的操作 (E₄)，通过 E₃ 与 E₄ 值的比较算出 LDL 胆甾醇的浓度。其结果为 178.6mg/dl，该数值与按超离心法获得的数值很一致。

应说明，图 2 中示出了按离心法分离的 HDL、LDL、VLDL 和人血清的时间过程。

实施例 10

试剂 A	MOPS 缓冲剂	10mM(pH=7)
	葡聚糖硫酸钠 ($M_w=500000$)	0.5mg/ml
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5mg/ml
	EMSE	0.3mg/ml
	过氧化物酶	10 μ /ml
	PEG 修饰的胆甾醇酯酶	2 μ /ml
	未修饰的胆甾醇氧化酶	3 μ /ml
	抗坏血酸氧化酶	3 μ /ml
B 试剂	MOPS 缓冲剂	10mM(pH=7)
	4 - 氨基安替比林	0.5mg/ml
	トリトン X - 100	3mg/ml
	EDTA $\cdot$ 4Na	5 μ /ml

作为 PEG 修饰的胆甾醇酯酶，使用与实施例 1 同样的酶。

使用上述的试剂，使用日立 7250 自动分析仪测定在实施例 2 中使用的血清试样 (E5)。使用一种胆甾醇浓度为 200mg/dl 的标准液进行同样的操作 (E6)，通过 E5 与 E6 数值的比较算出 LDL 胆甾醇的浓度。其结果为 177.3mg/dl，该数值与按超离心法获得的数值很一致。应说明，自动分析仪的测光点是在添加试剂 B5 分钟之后。

实施例 11

(1) 酶的化学修饰

将一种由假单胞菌获得的胆甾醇酯酶 1g 溶解于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH=8) 100ml 中，冷却至 15℃ 后，向其中添加 Sunbright VFM4101 [日本油脂 (株) 制] 25g，使其反应 4 小时。直接使用该反应液 (PEG 部分的分子量 = 6000) 作为试剂 B 的 PEG 修饰的胆甾醇酯酶。另外，使用一种由短杆菌得来的胆甾醇氧化酶 1g 和 Sunbright VFM 4101 0.5g 进行与上述同样的反应。直接使用

该反应液 (PEG 部分的分子量 = 6000) 作为试剂 A 的 PFG 修饰的胆甾醇氧化酶。

(2) LDL 胆甾醇的定量

试剂 A	MOPS 缓冲剂	20mM(pH=7)
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2g/l
	过氧化物酶	30 u /ml
	PEG 修饰的胆甾醇酯酶	2 u /ml
	PEG 修饰的胆甾醇氧化酶	5 u /ml
	胆酸钠	1g/l
	EMSM	0.3g/l
	抗坏血酸氧化酶	3 u /ml
试剂 B	MOPS 缓冲剂	20mM(pH=7)
	未修饰的胆甾醇酯酶	3 u /ml
	4 - 氨基安替比林	0.4g/l

将一种按离心法测得含有 LDL 胆甾醇 228.4mg/dl 的血清, ①直接地; ②用生理食盐水稀释为 8/10; ③同样地稀释为 6/10; ④同样地稀释为 4/10; ⑤同样地稀释为 2/10; 以及⑥只使用生理食盐水, 将它们分别地作为试样进行如下操作。

将试样 20 μ l 添加到试剂 A 2.25ml 中, 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟以除去 LDL 以外的脂蛋白中的胆甾醇。然后添加试剂 B 0.75ml, 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟后测定在波长 600nm 处的吸光度。所获结果示于图 3 中。

另一方面, 向一种预先将试剂 A 与试剂 B 按 3: 1 的比例混合而成的液体中添加一种含有胆甾醇 200mg/dl 的标准液 20 μ l, 在 37 $^{\circ}$ C 下培养 5 分钟后, 根据在 600nm 处测得的吸光度算出上述血清试样中的 LDL 胆甾醇浓度, 所获结果为 229.7mg/dl, 该数值与按离心法获得的数值很一致。

实施例 12

使用在实施例 11 的 (2) 中记载的试剂 B, 向试剂 A 中加入下列各种组合的凝聚剂和二价金属盐并将其作为试剂 A 使用, 使用

日立 7070 自动分析仪（条件为：试样 $4\ \mu\text{l}$ 、试剂 A， $270\ \mu\text{l}$ 、试剂 B， $90\ \mu\text{l}$ ）分别测定在实施例 11 的（2）中使用的血清试样。另一方面，使用日立 RPL 42T_{ロータ}，按照“现代医疗，第 23 卷（第 1 号），113 页，1991 年”记载的方法（超离心法）定量分析 LDL 胆固醇。其结果如表 2 所示，每一个结果都与按离心法获得的数值很一致。

甲	磷钨酸	0.1 mg/ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg/ml
乙	葡聚糖硫酸钠（Mw=20000）	0.1 mg/ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg/ml
丙	肝素钠	0.3 mg/ml
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	3 mg/ml
丁	PEG 20000	20 mg/ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 mg/ml
戊	磷钨酸	0.1 mg/ml
	葡聚糖硫酸钠（Mw=200000）	0.1 mg/ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg/ml
己	磷钨酸	0.1mg/ml
	肝素钠	0.1mg/ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg/ml
庚	葡聚糖硫酸（Mw=500000）	0.1 mg/ml
	PEG 6000	5mg/ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2mg/ml

表 2

试剂 A	测定值
甲	224.5 mg/dl
乙	229.1 mg/dl
丙	226.6 mg/dl
丁	227.3 mg/dl

戊	227.0 mg/dl
己	230.8 mg/dl
庚	225.9 mg/dl
超离心法	228.4mg/dl

实施例 13

使用 Sunbright AKM 1511 [日本油脂(株)制]、聚氨酯 P4000activated (ベーリンガーマンハイム 社制) 或葡聚糖 T40, TCT-activated (ベーリンガーマンハイム 社制) 代替 Sunbright VFM410, 与实施例 11 (1) 同样地对酶进行化学修饰。使用实施例 11 (2) 中记载的试剂 B, 使用按上述方法获得的化学修饰酶代替试剂 A 中的 PEG 修饰胆甾醇酯酶和 PEG 修饰胆甾醇氧化酶, 与实施例 11 (2) 同样地测定实施例 11 (2) 中使用的血清试样。其结果分别为 228.0 mg/dl, 229.1 mg/dl, 226.8 mg/dl, 这些数值与按离心法获得的数值很一致。

实施例 14

使用浓度为 300 u/ml 的过氧化氢酶代替在实施例 11 (2) 中记载的试剂 A 中的过氧化物酶, 向试剂 B 中加入过氧化物酶 300 u/ml 和叠氮化钠 0.5mg/ml, 与实施例 11 (2) 同样地测定在实施例 11 (2) 中使用的血清试样。其结果为 228.6 mg/dl, 该数值与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 15

使用在实施例 11 (2) 中记载的试剂 B, 使用同样浓度的 TOOS (测定波长 555nm)、DAOS (测定波长 593nm)、MAOS (测定波长 630nm) 或 TOPS (测定波长 550nm) 代替试剂 A 中的 EMSE, 与实施例 11 (2) 同样地测定在实施例 11 (2) 中使用的血清试样。其结果分别为 227.9 mg/dl、227.4 mg/dl、225.2 mg/dl、224.8 mg/dl, 这些数值与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 16

删去在实施例 11 (2) 中记载的试剂 A 中的 EMS, 使用浓

度为 0.1mg/ml 的 MCDP (测定波长 666nm) 或 BCMA 硫酸盐 (测定波长 755nm), 与实施例 11 (2) 同样地测定实施例 11 (2) 中使用的血清试样。其结果分别为 228.3 mg/dl、229.0 mg/dl, 这些数值与超离心法获得的数值很一致。

实施例 17

使用实施例 11 (2) 中记载的试剂 A, 向试剂 B 中加入聚氧乙烯单月桂酸酯 5mg/ml、トリトン X-100, 5mg/ml 或十二烷基苯磺酸钠 1mg/ml, 与实施例 11 (2) 同样地测定在实施例 11 (2) 中使用的血清试样。在反应 3 分钟结束后, 获得的结果分别为 228.6 mg/dl、226.1 mg/dl、227.0 mg/dl, 这些数值与按离心法获得的数值很一致。

实施例 18

使用实施例 11 (2) 中记载的试剂 A, 使用聚氧乙烯单月桂酸酯 5mg/ml、トリトン X-100, 5mg/ml 或十二烷基苯磺酸钠 1mg/ml 代替试剂 B 中未修饰的胆甾醇酯酶, 与实施例 11 (2) 同样地测定在实施例 11 (2) 中使用的血清试样。反应在 3 分钟内结束, 其结果分别为 227.9 mg/dl、229.2 mg/dl、226.1 mg/dl, 这些数值与按超离心法获得的数值很一致。

实施例 19

使用实施例 11 (2) 中记载的试剂 B, 使用相同浓度的去氧胆酸或牛磺胆酸代替试剂 A 中的胆酸, 与实施例 11 (2) 同样地测定实施例 11 (2) 中使用的血清试样。其结果分别为 229.9 mg/dl、225.7 mg/dl, 这些数值与按超离心法获得的数值很一致。

根据本发明, 可以提供一种不需要烦杂的分离操作即可简便地定量 LDL 胆甾醇的方法。

图 1

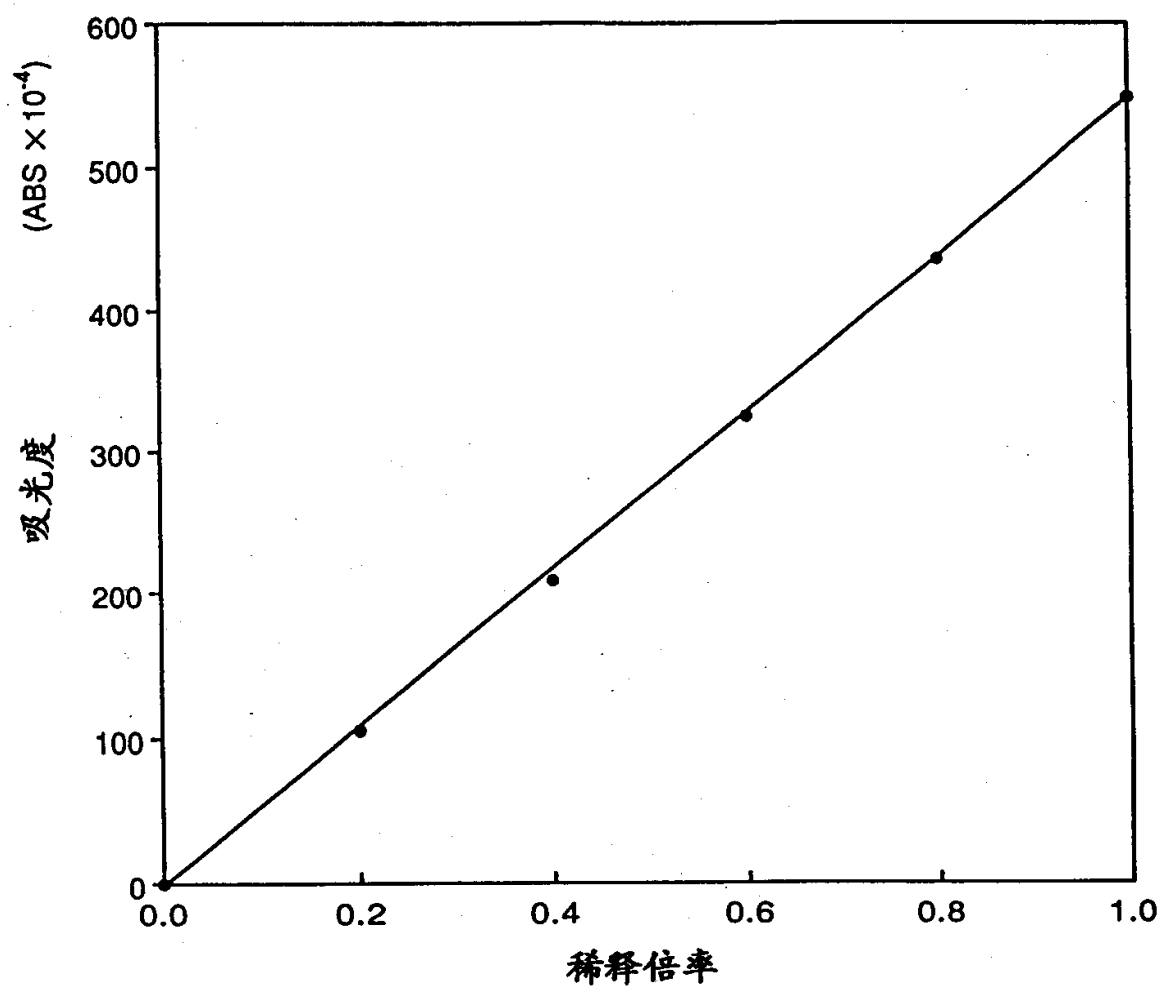


图 2

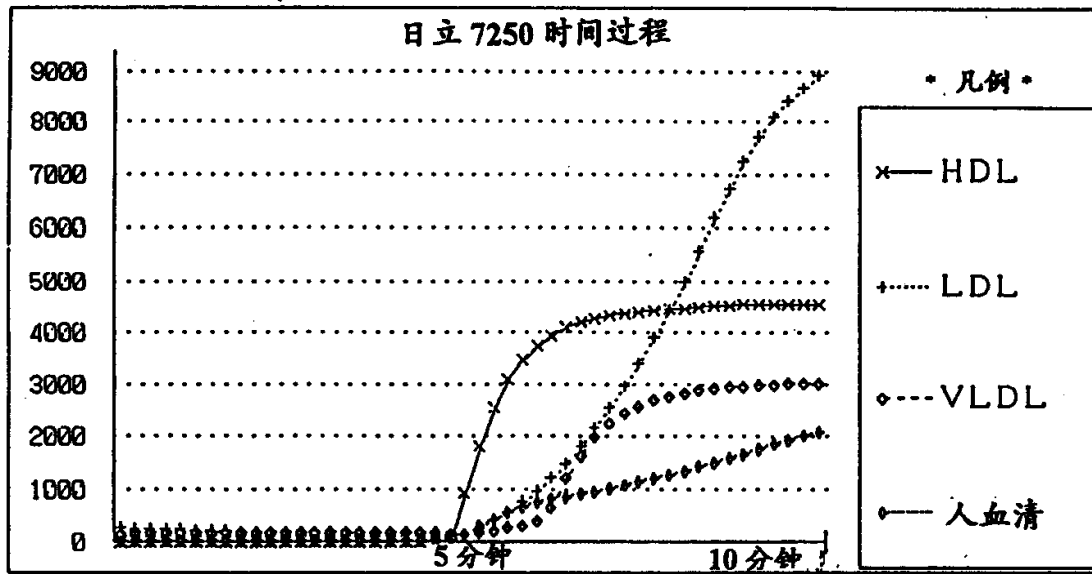


图 3

