



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109680036 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201811157318.5

(22)申请日 2018.09.30

(30)优先权数据

2017-192867 2017.10.02 JP

2018-185144 2018.09.28 JP

(71)申请人 爱科来株式会社

地址 日本京都府

(72)发明人 笠井拓步 米原聪

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理

有限责任公司 11258

代理人 张永玉

(51)Int.Cl.

C12Q 1/37(2006.01)

C12Q 1/28(2006.01)

C12Q 1/26(2006.01)

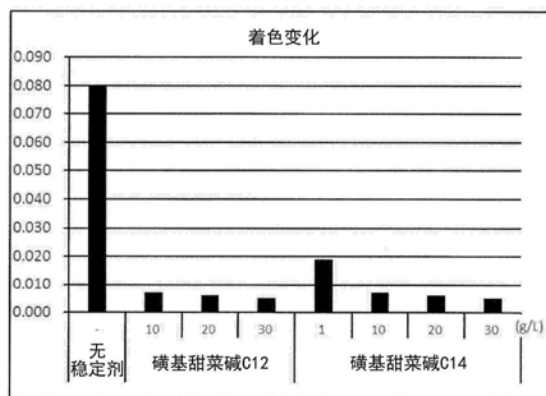
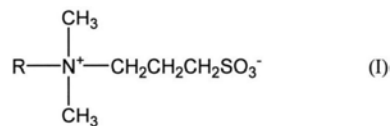
权利要求书1页 说明书15页 附图2页

(54)发明名称

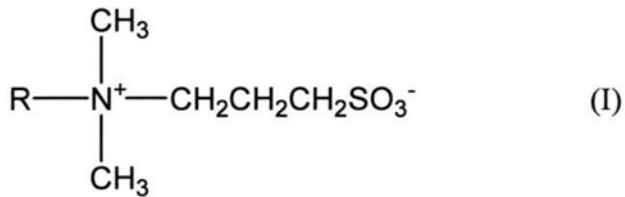
糖化蛋白质的测定

(57)摘要

本发明涉及一种糖化蛋白质的测定,并提供一种适于糖化蛋白质的酶法测定并含有能够使隐色型染料稳定的化合物的试剂。一种试剂,用于基于酶法的糖化蛋白质的测定中,包括:隐色型染料;以及下述式(I)的化合物,在式(I)中,R表示碳数8-17的烃链。



1. 一种试剂,用于基于酶法的糖化蛋白质的测定中,包括:
隐色型染料;以及
下述式(I)的化合物,



在式(I)中,R表示碳数8-17的烃链。

2. 根据权利要求1所述的试剂,其中,
糖化蛋白质是糖化血红蛋白或者糖化白蛋白。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂,其中,
糖化蛋白质是血红蛋白A1c。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的试剂,其中,
所述试剂将式(I)的化合物至少作为所述隐色型染料的稳定剂而包含。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的试剂,其中,
所述隐色型染料是10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪、N,N,N',N',N'',N''-己烷(3-磺丙基)-4,4',4''-三氨基三苯基甲烷、N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲基氨基)二苯胺或者它们的盐。

6. 一种试剂盒,用于通过酶法来测定糖化蛋白质,包括:
含有过氧化物酶的试剂;以及
作为不同于该试剂的其他试剂的、权利要求1至5中任一项所述的试剂。

7. 一种测定方法,其中,
所述测定方法是包括下述(1)至(5)的血红蛋白A1c的测定方法,
所述测定方法包括:使试样与权利要求1至5中任一项所述的试剂混合,
(1) 使试样中的血红蛋白变性;
(2) 通过试样中的糖化血红蛋白与蛋白酶的反应,生成N末端糖化肽;
(3) 通过N末端糖化肽与果糖基肽氧化酶的反应,生成过氧化氢;
(4) 通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色;
(5) 测定显色信号而计算血红蛋白A1c量以及血红蛋白量。

8. 一种测定方法,其中,
所述测定方法是包括下述(1)至(4)的血红蛋白A1c的测定方法,
所述测定方法包括:使试样与权利要求1至5中任一项所述的试剂混合,
(1) 使试样中的血红蛋白变性;
(2) 通过试样中的糖化血红蛋白与糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶的反应,生成过氧化氢;
(3) 通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色;
(4) 测定显色信号而计算血红蛋白A1c量以及血红蛋白量。

糖化蛋白质的测定

技术领域

[0001] 本公开涉及糖化蛋白质的测定,更具体而言,涉及包含隐色型染料的稳定化的糖化蛋白质的测定。

背景技术

[0002] 血液中的作为葡萄糖与各种蛋白质的反应产物的糖化蛋白质的浓度是中长期的血糖水平的指标。尤其,血红蛋白A1c (HbA1c)、糖化白蛋白、果糖胺等是在临床检查中被频繁测定的物质,并且广泛用于糖尿病的诊断、治疗状态的监视。HbA1c的相对于总血红蛋白的比率HbA1c%除了用于血糖水平的监视之外,还是与糖尿病的诊断相关的重要的检查项目,其中,HbA1c是β链N末端被糖化的血红蛋白。

[0003] HbA1c%的测定通过高效液相层析(HPLC,High-Performance Liquid Chromatography)法、硼酸亲和法、免疫比浊法、酶法等来进行。其中,酶法试剂作为能够以最低成本测定HbA1c%的方法论而被社会关注。

[0004] 作为利用酶法试剂的HbA1c%的测定的一个例子,可以举出包含下述(1)~(4)的工序的方法。

[0005] (1)使血红蛋白变性,并通过吸光光度法来定量的工序;

[0006] (2)通过蛋白酶而加水分解HbA1c的被糖化的N末端附近的工序;

[0007] (3)通过酶来氧化由加水分解产生的具有被糖化的N末端的寡肽,从而生成过氧化氢的工序;

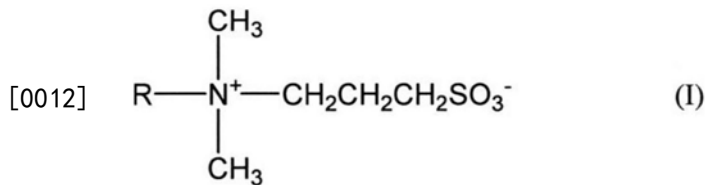
[0008] (4)通过过氧化氢与过氧化物酶的反应,使作为显色基质的隐色型染料显色,并通过吸光光度法来定量HbA1c的工序。

[0009] 在如HbA1c那样的微量成分的测定中使用作为高灵敏度显色剂的隐色型染料:DA-64、DA-67。这些显色剂尽管具有优异的灵敏度,但还具有由于暴露于氧气、光、水等而着色的缺点。尤其在测定试剂不是干燥试剂而是溶液试剂的情况下,这样的劣化显著。为了解决该问题,在日本专利第5274590号公报、日本专利第3604198号公报以及日本专利特开2013-104007号公报中公开了以防止显色剂的氧化为目的、在显色剂溶液中添加还原剂而实现稳定化的技术。另外,在日本专利第5616498号公报中,公开了通过表面活性剂的添加来实现显色剂的稳定化的技术。

发明内容

[0010] 本公开在一个方式中提供试剂以及使用了该试剂的糖化蛋白质的酶法测定,所述试剂适用于糖化蛋白质的酶法测定,并含有能够使隐色型染料稳定的化合物。

[0011] 本公开在一个方式中涉及一种试剂,用于基于酶法的糖化蛋白质的测定中,包括:隐色型染料;以及下述式(I)的化合物(以下,也称为“本公开涉及的试剂”)。



[0013] 在式(I)中,R表示碳数8-17的烃链。

[0014] 本公开在其他一个方式中涉及一种试剂盒,用于通过酶法来测定糖化蛋白质,所述试剂盒包括:含有过氧化物酶的试剂;以及作为不同于该试剂的其他试剂的、本公开涉及的试剂。

[0015] 本公开在其他一个方式中涉及一种测定方法,其中,所述测定方法是包括下述(1)至(5)的HbA1c的测定方法,所述测定方法包括:使试样与本公开涉及的试剂混合,

[0016] (1) 使试样中的血红蛋白变性;

[0017] (2) 通过试样中的糖化血红蛋白与蛋白酶的反应,生成N末端糖化肽;

[0018] (3) 通过N末端糖化肽与果糖基肽氧化酶的反应,生成过氧化氢;

[0019] (4) 通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色;

[0020] (5) 测定显色信号而计算HbA1c量以及血红蛋白量。

[0021] 本公开在其他一个方式中涉及一种测定方法,其中,所述测定方法是包括下述(1)至(4)的血红蛋白A1c的测定方法,所述测定方法包括:使试样与本公开涉及的试剂混合,

[0022] (1) 使试样中的血红蛋白变性;

[0023] (2) 通过试样中的糖化血红蛋白与糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶的反应,生成过氧化氢;

[0024] (3) 通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色;

[0025] (4) 测定显色信号而计算HbA1c量以及血红蛋白量。

[0026] 根据本公开,提高隐色型染料的稳定性,因此能够在糖化蛋白质的测定中,例如在HbA1c的测定中,抑制精度的降低。

附图说明

[0027] 图1是评价了试验化合物的由加热处理进行的隐色型染料的自然显色的抑制效果的图表;

[0028] 图2是评价了试验化合物的由加热处理进行的隐色型染料的自然显色抑制效果的浓度依赖性的图表;

[0029] 图3是评价了试验化合物的血红蛋白变性能力的图表;

[0030] 图4是评价了试验化合物的蛋白酶反应促进能力的图表。

具体实施方式

[0031] 本公开基于如下知识:用于糖化蛋白质的酶法测定的隐色型染料的稳定性在具有预定碳数的烷基的磺基甜菜碱的存在下提高。根据本公开,能够提高试剂溶液中的隐色型染料的稳定性。

[0032] 在本公开中,糖化蛋白质的测定在一个实施方式中,包括糖化蛋白质量的测定,在其他一个实施方式中,包括糖化蛋白质量以及蛋白质量的测定,在又一其他一个实施方式

中,可以包括测定糖化蛋白质质量和蛋白质质量而求出它们之比。

[0033] 关于本公开涉及的测定方法中测定的糖化蛋白质,可以举出果糖胺、糖化白蛋白、糖化血红蛋白等,在一个实施方式中,为糖化白蛋白或者糖化血红蛋白。

[0034] 作为糖化血红蛋白,可以举出如下:

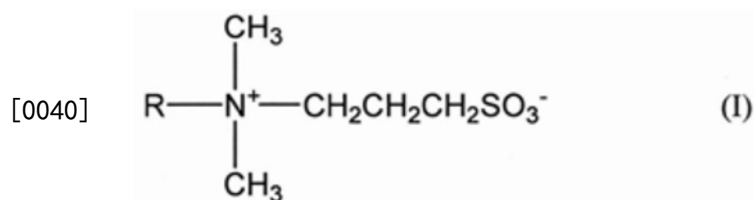
[0035] HbA1c:Hbβ链N末端被糖化的;

[0036] GHbLys:Hb的Lys的氨基被糖化的;

[0037] GHba:Hb的α链N末端被糖化的。

[0038] [具有隐色型染料的稳定化能力的化合物]

[0039] 本公开涉及的试剂含有隐色型染料以及下述式(I)的化合物。下述式(I)的化合物能够使隐色型染料稳定化。因此,本公开涉及的试剂在一个或多个实施方式中,为了隐色型染料稳定化而含有有效量的下述式(I)的化合物。



[0041] 式(I)中,R表示碳数8-17的烃基。

[0042] 式(I)中,从不阻碍糖化蛋白质的酶法测定的观点以及隐色型染料的稳定性提高的观点出发,R的碳数优选为12至16,更优选为14。从相同的观点出发,R的烃基优选为烷基,更优选为直链烷基。从相同的观点出发,R优选为十二烷基以及十四烷基,更优选为十四烷基。

[0043] 从不阻碍糖化蛋白质的酶法测定的观点以及隐色型染料的稳定性提高的观点出发,在一个或多个实施方式中,本公开涉及的试剂中的式(I)的化合物的含量优选为0.1g/L以上、更优选为1g/L以上、进一步优选为5g/L以上、进一步更优选为10g/L以上、进一步更优选为20g/L以上。另外,式(I)的化合物的含量例如为50g/L以下、或者40g/L以下。

[0044] [隐色型染料]

[0045] 作为本公开中的隐色型染料,优选在微量检测中能够使用的高灵敏度的染料。在一个或多个实施方式中,可以举出吩噻嗪类染料、三苯甲烷类染料、二苯胺类染料、o-苯二胺、羟基丙酸、二氨基联苯胺、四甲基联苯胺等,从隐色型染料的稳定性提高的观点出发,优选吩噻嗪类染料。

[0046] 作为吩噻嗪类染料,可以举出10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪或者其盐,可以举出10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪钠(DA-67)。

[0047] 作为三苯甲烷类染料,可以举出N,N,N',N',N'',N''-己烷(3-磺丙基)-4,4',4''-三氨基三苯基甲烷或者其盐,可以举出N,N,N',N',N'',N''-己烷(3-磺丙基)-4,4',4''-三氨基三苯基甲烷六钠(TPMPs)。

[0048] 作为二苯胺类染料,可以举出N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲基氨基)二苯胺(DA-64)。

[0049] 从确保充分的测定灵敏度的观点出发,在一个或多个实施方式中,本公开涉及的试剂中的隐色型染料的含量优选为0.005mmol/L以上、更优选为0.01mmol/L以上、进一步优

选为0.03mmol/L以上。另外,从隐色型染料的稳定性提高的观点出发,隐色型染料的含量优选为2mmol/L以下、更优选为0.5mmol/L以下。

[0050] 从得到充分的稳定化效果的观点出发,在一个或多个实施方式中,本公开涉及的试剂中的式(I)的化合物相对于隐色型染料的含量比(摩尔比,式(I)的化合物的物质的量/隐色型染料的物质的量)优选为5以上、更优选为50以上、进一步优选为1000以上。另外,从确保充分的测定灵敏度的观点出发,隐色型染料的含量比优选为10000以下、更优选为5000以下。

[0051] 本公开涉及的试剂可以是溶液试剂的形态,也可以是干燥试剂的形态。在溶液试剂的情况下,在一个或多个实施方式中,本公开涉及的试剂pH优选为5以上、更优选为6以上。在一个或多个实施方式中,本公开涉及的试剂pH优选为9以下、更优选为8以下。此外,pH是在25℃的温度下通过pH测量计来测定的值。

[0052] 根据本公开涉及的试剂,在一个或多个实施方式中,能够将试剂的保存期间设为较长。另外,在其他一个或多个实施方式中,通过减少灵敏度变化,能够减少校正的次数。在又一其他一个或多个实施方式中,也能够高的温度(例如,2~50℃)下保存试剂。

[0053] 在一个或多个实施方式中,关于根据使用了本公开涉及的试剂的糖化蛋白质的测定中的隐色型染料的显色信号来进行的HbA1c等糖化蛋白质量、血红蛋白等的蛋白质量的计算,能够通过公知的方法来进行。

[0054] [实施方式A]

[0055] 本公开涉及的试剂在不受限的实施方式A中,在包含下述(1)至(5)的HbA1c的测定方法中,能够作为混合于试样中的试剂而被使用。

[0056] (1)使试样中的血红蛋白变性。

[0057] (2)通过试样中的糖化血红蛋白与蛋白酶的反应,生成N末端糖化肽。

[0058] (3)通过N末端糖化肽与果糖基肽氧化酶(FPOX)的反应,生成过氧化氢。

[0059] (4)通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶(POD)的反应,使隐色型染料显色。

[0060] (5)测定显色信号而计算HbA1c量以及血红蛋白量。

[0061] 此外,在本公开中,试剂的“与试样混合”包括向试样添加试剂、以及向试剂添加试样。

[0062] 本公开涉及的试剂在本实施方式A的一个或多个实施方式中,至少为了供应上述(4)的隐色型染料而被混合到试样中。即,关于在包含上述(1)至(5)的HbA1c的测定方法中的隐色型染料,使用本公开涉及的试剂中所含的染料。本公开涉及的试剂在本实施方式A的其他一个或多个实施方式中,至少为了在上述(4)中使隐色型染料显色而被混合到试样中。

[0063] 在实施方式A在双试剂系统中进行的情况下,通常向试样依次添加第一试剂以及第二试剂的两个试剂、或者试样与这些试剂混合。在不受限的一个或多个实施方式中,通过第一试剂的添加或者混合,进行上述(1)的血红蛋白的变性,在第一试剂的添加或混合后、且第二试剂的添加或混合前,测定用于血红蛋白量测定的吸光度。根据第一试剂的组成,通过第一试剂的添加来进行上述(1)以及(2),通过添加第二试剂或者与第二试剂混合来进行(1)至(4)全部。因此,用于HbA1c量测定的吸光度的测定在紧接第二试剂的添加或者混合之前或之后和第二试剂的添加或者混合经过一定时间之后被测定。基于吸光度的变化值而计算HbA1c量。

[0064] 在不受限的一个或多个实施方式中,本公开涉及的试剂能够作为下述构成A1以及A2的第二试剂、下述构成A3以及A4的第一试剂而被使用。但是,本公开涉及的试剂不局限于这些实施方式。第一试剂以及第二试剂还可以包括其他成分(例如,其他缓冲剂、变性剂或者隐色型染料稳定剂等)。

[0065] 构成A1

[0066] 第一试剂:FPOX、POD、变性剂、缓冲剂

[0067] 第二试剂:蛋白酶、式(I)的化合物、隐色型染料、缓冲剂

[0068] 构成A2

[0069] 第一试剂:蛋白酶、POD、变性剂、缓冲剂

[0070] 第二试剂:FPOX、式(I)的化合物、隐色型染料、缓冲剂

[0071] 构成A3

[0072] 第一试剂:FPOX、式(I)的化合物、隐色型染料、缓冲剂

[0073] 第二试剂:蛋白酶、POD、缓冲剂

[0074] 构成A4

[0075] 第一试剂:蛋白酶、式(I)的化合物、隐色型染料、缓冲剂

[0076] 第二试剂:FPOX、POD、缓冲剂

[0077] 因此,本公开涉及的试剂还可以包括缓冲剂、蛋白酶、以及果糖基肽氧化酶(FPOX)的至少一者。

[0078] 作为实施方式A中的缓冲剂,能够使用能够调整到中性附近且不损伤反应系统的缓冲剂。作为缓冲剂的不受限的例子,可以举出N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES,N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、3-吗啉代丙磺酸(MOPS,3-Morpholinopropanesulfonic acid)、N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid)、2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸(HEPES,2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid)、N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸(TRICINE,N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine)、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)(PIPES,Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid))、哌嗪-1,4-双(2-羟基-3-丙磺酸)脱水(POPSO,Piperazine-1,4-bis(2-hydroxy-3-propanesulfonic acid) dehydrate)、碳酸、磷酸、硼酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、牛磺酸、天冬氨酸、天冬酰胺、羟脯氨酸、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、缬氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、色氨酸、羟甲基氨基甲烷、二甲基氨基乙醇、三乙醇胺、二乙醇胺、单乙醇胺、N-甲基氨基乙醇、肌酐、咪唑、巴比妥、氨、乙胺、二乙胺、三乙胺等。

[0079] 作为实施方式A中的蛋白酶,能够使用在中性附近具有活性、且能够与糖化血红蛋白反应而生成N末端糖化肽(在本公开中,包括糖化氨基酸)的蛋白酶。产生生物种、酶家族不受特别限制。作为蛋白酶的不受限的例子,可以举出丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶等。外切蛋白酶更优于内切蛋白酶。

[0080] 实施方式A中的果糖基肽氧化酶(FPOX)能够将N末端糖化肽(包括糖化氨基酸)作为基质,并使用产生过氧化氢的酶,该过氧化氢是能够检测的中间产物。产生生物种等不受特别限制。还能够使用被称为阿马多里酶、果糖基氨基酸氧化酶的酶,在本公开中,包含于

FPOX中。

[0081] 实施方式A中的过氧化物酶(POD)能够使用与过氧化氢反应而使作为显色基质的隐色型染料显色的酶。产生生物种等不受特别限制。作为不受限的例子,可以举出源自辣根的过氧化物酶。

[0082] 作为实施方式A中的变性剂,能够使用能够变性血红蛋白、且不会显著损伤第一试剂中所含的酶的活性的变性剂。作为变性剂的不受限的例子,可以举出下述(1)至(8)。此外,(1)~(7)还可以与亚硝酸盐并用。

[0083] (1) 3-月桂基二甲基氨基丁酸(3-Lauryldimethylaminobutyric acid)

[0084] (2) 3-肉豆蔻基二甲基氨基丁酸(3-Myristyldimethylaminobutyric acid)

[0085] (3) 月桂基二甲基氨基丙磺酸(Lauryldimethylaminopropanesulfonic acid)

[0086] (4) 肉豆蔻基二甲基氨基丙磺酸(Myristyldimethylaminopropanesulfonic acid)

[0087] (5) 月桂酰胺基二甲基氨基丁酸(Laurylamidepropyldimethylaminobutyric acid)

[0088] (6) 肉豆蔻酰胺丙基甜菜碱(Myristamidepropyl betaine)

[0089] (7) n-十二烷基-βD-麦芽糖苷(n-Dodecyl-βD-maltoside)

[0090] (8) WST-3

[0091] 或者,实施方式A中的变性剂可以替代上述(1)至(8)而为式(I)的化合物。式(I)的化合物能够使血红蛋白变性,并且能够促进蛋白酶的反应。

[0092] 作为实施方式A中的测定对象试样,可以举出包含血红蛋白以及糖化血红蛋白的试样。作为测定对象试样,在不限的一个或多个实施方式中,可以举出包含全血、血球等的红细胞的试样、使该试样溶血的试样。在测定对象试样是包含红细胞的试样的情况下,可以由第一试剂溶血,也可以由不同于第一试剂的其他手段溶血而作为溶血试样。红细胞的溶血能够由现有的方法实施。例如,存在使用渗透压的方法(例如,水)、使用表面活性剂的方法、冷冻的方法、使用超声波的方法等。

[0093] 在一个或多个实施方式中,作为本公开的显色信号,可以举出吸光度、反射率以及透过率等。

[0094] 在一个或多个实施方式中,HbA1c量的计算包括将由测定得到的显色信号基于预定的换算因素换算为HbA1c量。在一个或多个实施方式中,基于预定的换算因素的HbA1c量的换算能够通过将由测定得到的吸光度等的显色信号基于下述(i)~(iv)中任一者换算规则换算为HbA1c量而进行。(iv)可以与(i)~(iii)组合而进行。

[0095] (i) 基于试样中的某已知的校准物质来求出校准曲线,将源自HbA1c的吸光度基于校准曲线换算为HbA1c量。

[0096] (ii) 将隐色型染料作为校准物质(校正用物质),求出隐色型染料的校准曲线,将隐色型染料的吸光度基于该隐色型染料的校准曲线换算为HbA1c量。

[0097] (iii) 取不同的波长中求出的吸光度比,基于相对于吸光度比的校准曲线换算为HbA1c量。

[0098] (iv) 取在试样与试剂的混合后紧接以及混合预定时间经过后测定的吸光度之差而求出吸光度变化量,基于相对于吸光度变化量的校准曲线换算为HbA1c量。

[0099] 在一个或多个实施方式中,作为(i)中的已知的校准物质,可以举出含有已知量的HbA1c的校正用标准物质。在一个或多个实施方式中,作为含有已知量的HbA1c的校正用标准物质,可以举出全血或血细胞的冷冻品、提炼它们的含有HbA1c的Hb溶液、或者在它们之中含有缓冲液组成物以及Hb的稳定剂等物质等。在一个或多个实施方式中,作为已知的校准物质,可以举出公共机构提供的一级标准物质或常用标准物质、试剂盒附带的校正物质等。

[0100] 在一个或多个实施方式中,作为(iv)中的混合后紧接,可以举出从试样与试剂的混合至5秒~30秒左右。在一个或多个实施方式中,作为预定时间经过后,可以举出从试样与试剂的混合至1分钟~3分钟左右。

[0101] 此外,上述方式是显色信号为吸光度的情况的一个例子,即使是吸光度以外的反射率以及透过率,也能够以同样的方式进行。

[0102] [实施方式B]

[0103] 本公开涉及的试剂在不受限的实施方式B中,在包含下述(1)至(4)的HbA1c的测定方法中,能够作为混合于试样中的试剂而被使用。

[0104] (1)使试样中的血红蛋白变性。

[0105] (2)通过试样中的糖化血红蛋白与糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶(直接型FPOX)的反应,生成过氧化氢。

[0106] (3)通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色。

[0107] (4)测定显色信号而计算HbA1c量以及血红蛋白量。

[0108] 本公开涉及的试剂在本实施方式B的一个或多个实施方式中,至少为了供应上述(3)的隐色型染料而混合于试样中。即,作为在包含上述(1)至(4)的HbA1c的测定方法中的隐色型染料,使用本公开涉及的试剂中所含的染料。本公开涉及的试剂在本实施方式B的其他一个或多个实施方式中,至少为了在上述(3)中显色隐色型染料而混合于试样中。

[0109] 实施方式B是实施方式A中的果糖基肽氧化酶(FPOX)成为糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶(直接型FPOX)、在反应系统中不需要蛋白酶的形态。

[0110] 在不受限的一个或多个实施方式中,本公开涉及的试剂能够作为下述构成B1和B2的第二试剂、以及下述构成B3和B4的第一试剂而被使用。但是,本公开涉及的试剂不局限于这些实施方式。第一试剂以及第二试剂还可以包括其他成分。

[0111] 构成B1

[0112] 第一试剂:POD、变性剂、缓冲剂

[0113] 第二试剂:直接型FPOX、式(I)的化合物、隐色型染料、缓冲剂

[0114] 构成B2

[0115] 第一试剂:直接型FPOX、变性剂、缓冲剂

[0116] 第二试剂:POD、式(I)的化合物、隐色型染料、缓冲剂

[0117] 构成B3

[0118] 第一试剂:POD、式(I)的化合物、隐色型染料、变性剂、缓冲剂

[0119] 第二试剂:直接型FPOX、缓冲剂

[0120] 构成B4

[0121] 第一试剂:直接型FPOX、式(I)的化合物、隐色型染料、变性剂、缓冲剂

[0122] 第二试剂:POD、缓冲剂

[0123] 在构成B1的情况下,在不受限的一个或多个实施方式中,通过第一试剂的添加或混合,进行上述(1)的血红蛋白的变性,在第一试剂的添加或混合后且第二试剂的添加或混合前测定用于血红蛋白量测定的吸光度。通过添加或混合第二试剂来进行(2)和(3)。因此,用于HbA1c量测定的吸光度的测定在紧接第二试剂的添加或混合之前或者之后和第二试剂的添加或混合经过一定时间之后被测定。基于吸光度的变化值而计算出HbA1c量。

[0124] 因此,本公开涉及的试剂还可以包括糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶(直接型FPOX)。

[0125] 实施方式B中的缓冲剂、蛋白酶、过氧化物酶(POD)、变性剂、测定对象试样、显色信号以及HbA1c的计算方法与实施方式A相同。

[0126] 实施方式B中的糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶(直接型FPOX)是被改良的FPOX,是在糖化血红蛋白中具有基质特异性(直接作用于糖化血红蛋白)的FPOX(W02015-005257以及W02015-060429)。

[0127] [试剂盒]

[0128] 本公开在其他方式中涉及用于通过酶法来测定糖化蛋白质的试剂盒,该试剂盒包括:含有过氧化物酶的试剂;以及作为不同于该试剂的其他试剂的、本公开涉及的试剂。

[0129] 本公开涉及的试剂盒可以是糖化蛋白质的酶法测定用的双试剂系统的试剂盒,也可以是三试剂系统的试剂盒。作为双试剂系统的试剂盒的构成,在不受限的一个或多个实施方式中,可以举出上述构成A1至A4、以及B1。

[0130] [测定方法]

[0131] 在其他方式中,本公开是包括下述(1)至(5)的HbA1c的测定方法,包括:至少为了供应下述(4)的隐色型染料而混合本公开涉及的试剂。

[0132] (1)使试样中的血红蛋白变性。

[0133] (2)通过试样中的糖化血红蛋白与蛋白酶的反应,生成N末端糖化肽。

[0134] (3)通过N末端糖化肽与果糖基肽氧化酶(FPOX)的反应,生成过氧化氢。

[0135] (4)通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶(POD)的反应,使隐色型染料显色。

[0136] (5)测定显色信号而计算HbA1c量以及血红蛋白量。

[0137] 在其他方式中,本公开是包括下述(1)至(4)的HbA1c的测定方法,包括:至少为了供应下述(3)的隐色型染料而混合本公开涉及的试剂。

[0138] (1)使试样中的血红蛋白变性。

[0139] (2)通过试样中的糖化血红蛋白与糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶(直接型FPOX)的反应,生成过氧化氢。

[0140] (3)通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色。

[0141] (4)测定显色信号而计算HbA1c量以及血红蛋白量。

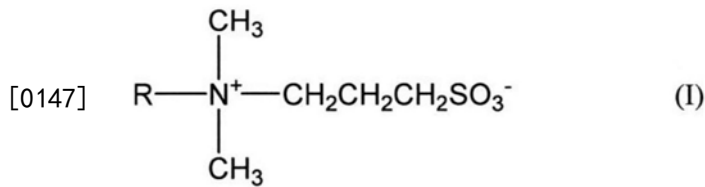
[0142] 关于本公开涉及的测定方法,如上述实施方式A以及B中说明那样。

[0143] 本公开还涉及以下的不受限的一个或多个实施方式。

[0144] (1)一种用于基于酶法的糖化蛋白质的测定中的试剂,包括:

[0145] 隐色型染料;以及

[0146] 下述式(I)的化合物。



[0148] 式(I)中,R表示碳数8-17的烃链。

[0149] (2)根据(1)所述的试剂,其中,糖化蛋白质是糖化血红蛋白或者糖化白蛋白。

[0150] (3)根据(1)或(2)所述的试剂,其中,糖化蛋白质是血红蛋白A1c。

[0151] (4)根据(1)至(3)中任一项所述的试剂,其中,所述试剂将式(I)的化合物至少作为所述隐色型染料的稳定剂而包含。

[0152] (5)根据(1)至(4)中任一项所述的试剂,其中,所述隐色型染料是10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪、N,N,N',N',N'',N''-己烷(3-磺丙基)-4,4',4''-三氨基三苯基甲烷、N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲基氨基)二苯胺或者它们的盐。

[0153] (6)一种试剂盒,用于通过酶法来测定糖化蛋白质,包括:含有过氧化物酶的试剂;以及作为不同于该试剂的其他试剂的、(1)至(5)中任一项所述的试剂。

[0154] (7)一种包括下述(1)至(5)的血红蛋白A1c的测定方法,包括:

[0155] 使试样与(1)至(5)中任一项所述的试剂混合。

[0156] (1)使试样中的血红蛋白变性。

[0157] (2)通过试样中的糖化血红蛋白与蛋白酶的反应,生成N末端糖化肽。

[0158] (3)通过N末端糖化肽与果糖基肽氧化酶的反应,生成过氧化氢。

[0159] (4)通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色。

[0160] (5)测定吸光度而计算血红蛋白A1c量以及血红蛋白量。

[0161] (8)一种包括下述(1)至(4)的血红蛋白A1c的测定方法,包括:

[0162] 使试样与(1)至(5)中任一项所述的试剂混合。

[0163] (1)使试样中的血红蛋白变性。

[0164] (2)通过试样中的糖化血红蛋白与糖化蛋白质直接型果糖基肽氧化酶的反应,生成过氧化氢。

[0165] (3)通过所生成的过氧化氢与过氧化物酶的反应,使隐色型染料显色。

[0166] (4)测定吸光度而计算血红蛋白A1c量以及血红蛋白量。

[0167] 实施例

[0168] 在以下的实施例中,使用了下述化合物。

[0169] 辛基磺基甜菜碱(Octylsulfobetain)(磺基甜菜碱C8):N-辛基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸(东京化成工业社制)

[0170] 癸基磺基甜菜碱(Decylsulfobetaine)(磺基甜菜碱C10):N-癸基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸(东京化成工业社制)

[0171] 月桂基磺基甜菜碱(Laurylsulfobetaine)(磺基甜菜碱C12):N-十二烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸(东京化成工业社制)

[0172] 十四烷基磺基甜菜碱(Tetradecylsulfobetaine)(磺基甜菜碱C14):N-十四烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸(东京化成工业社制)

[0173] 十六烷基磺基甜菜碱(Hexadecylsulfobetaine)(磺基甜菜碱C16):N-十六烷基-

N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸(东京化成工业社制)

[0174] 十八烷基磺基甜菜碱(Octadecylsulfobetaine)(磺基甜菜碱C18):N-十八烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸(东京化成工业社制)

[0175] DA-67(隐色型染料):10-(羧甲基氨基羰基)-3,7-双(二甲基氨基)吩噻嗪钠(东京化成工业社制)

[0176] [隐色型染料的稳定化评价1]

[0177] 本实验为了确认有助于隐色型染料的稳定化的磺基甜菜碱而进行。在100mmol/L的Tris-PIPES缓冲剂(pH6.8)中溶解隐色型染料(DA-67)以使得变成0.045mmol/L,在该溶液20mL中添加表1所示的稳定剂而调制试剂,针对所调制的试剂,在25℃下进行24小时的加热处理。此后,使用生化学自动分析装置(JCA-BM-6010,日本电子社制),通过以下的测定参数,将精制水作为待测体而进行测定,由此测定试剂的着色量。针对在25℃下进行24小时的加热处理前的试剂,也进行同样的着色量的测定,基于加热处理的该吸光度的变化大小来求出加热处理前与加热处理后的着色量之差,并评价针对隐色型染料的稳定化能力。其结果如表1和图1所示。

[0178] <第一试剂>

[0179] PIPES缓冲剂(pH6.4)

[0180] <第二试剂>

[0181] 蛋白酶(商品名NEP-209、东洋纺社制):2U/mL

[0182] DA-67:45μmol/L

[0183] 表1所示的磺基甜菜碱1g/L

[0184] PIPES缓冲剂(pH6.8)

[0185] 用于试剂着色量的评价的测定参数为如下所示。

[0186] 测定主波长:658nm

[0187] 测定次波长:694nm

[0188] 待测体(精制水)分注量(dispensing amount):8μL

[0189] 第一试剂分注量:96μL

[0190] 第二试剂分注量:24μL

[0191] 第一测光点:17-19

[0192] 第二测光点:21

[0193] 表1

[0194]

| | 稳定剂 1g/L | 处理前 | 处理后 | 差 | 着色率 |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-----|
| 比较例 1 | 无 | 0.007 | 0.025 | 0.017 | 100 |
| 实施例 1 | 磺基甜菜碱 C8 | 0.008 | 0.024 | 0.016 | 89 |
| 实施例 2 | 磺基甜菜碱 C10 | 0.008 | 0.023 | 0.015 | 89 |
| 实施例 3 | 磺基甜菜碱 C12 | 0.004 | 0.007 | 0.003 | 19 |
| 实施例 4 | 磺基甜菜碱 C14 | 0.004 | 0.007 | 0.003 | 17 |
| 实施例 5 | 磺基甜菜碱 C16 | 0.003 | 0.007 | 0.004 | 22 |

[0195] 如图1和表1所示,在实施例1-5中,与比较例1相比,着色率降低。实施例3-5中的着色率的降低尤其显著。

[0196] [隐色型染料的稳定化评价2]

[0197] 本实验为了确认隐色型染料的稳定性的提高依赖磺基甜菜碱的浓度的情况而进行。在100mmol/L的Tris-PIPES缓冲剂(pH6.8)中溶解隐色型染料(DA-67)以使得变成0.045mmol/L,在该溶液5mL中添加表2所示的稳定剂而调制试剂,针对所调制的试剂,在25℃下进行24小时的加热处理。此后,使用生化学自动分析装置(JCA-BM-6010、日本电子社制),通过以下的测定参数,将精制水作为待测体而进行测定,由此测定试剂的着色量。针对在25℃下进行24小时的加热处理前的试剂,也进行同样的着色量的测定,基于加热处理的该吸光度的变化大小来求出加热处理前与加热处理后的着色量之差,并评价针对隐色型染料的稳定化能力。其结果如表2和图2所示。

[0198] 试剂着色量的评价中使用的测定参数为如下所示。

[0199] 测定主波长:658nm

[0200] 测定次波长:694nm

[0201] 待测体(精制水)分注量:8μL

[0202] 第一试剂分注量:96μL

[0203] 第二试剂分注量:24μL

[0204] 第一测光点:17-19

[0205] 第二测光点:21

[0206] 其结果如表2和图2所示。

[0207] 表2

[0208]

| | 稳定剂 | 浓度 g/L | 处理前 | 处理后 | 差 | 着色率 |
|--------|-----------|-----------|-------|-------|-------|-----|
| 比较例 2 | 无稳定剂 | - | 0.006 | 0.086 | 0.080 | 100 |
| 实施例 6 | 磺基甜菜碱 C12 | 10 | 0.005 | 0.012 | 0.007 | 9 |
| 实施例 7 | | 20 | 0.005 | 0.011 | 0.006 | 7 |
| 实施例 8 | | 30 | 0.005 | 0.011 | 0.005 | 7 |
| 实施例 9 | 磺基甜菜碱 C14 | 1 | 0.005 | 0.024 | 0.019 | 24 |
| 实施例 10 | | 10 | 0.005 | 0.012 | 0.007 | 9 |
| 实施例 11 | | 20 | 0.006 | 0.011 | 0.006 | 7 |
| 实施例 12 | | 30 | 0.007 | 0.012 | 0.005 | 6 |

[0209] 如图2和表2所示,磺基甜菜碱C12以及磺基甜菜碱C14的添加量越多越针对隐色型染料示出了显色抑制。即,稳定了隐色型染料。

[0210] [血红蛋白A1c (HbA1c) 的测定1]

[0211] 本实验为了表示通过添加了磺基甜菜碱的酶试剂能够高精度地测定HbA1c%的情况而进行。通过市售的测定试剂、以及添加了实施例13-20的稳定剂的试剂(下述第一试剂以及第二试剂)来测定源自糖尿病患者的血球待测体(37待测体),通过针对测定值进行相关分析来评价这些实施例的针对临床检查的应用可能性。结果如下述表3所示。

[0212] 此外,关于血红蛋白浓度以及血红蛋白A1c浓度,通过取不同波长(测定主波长以及测定次波长)中求出的吸光度比,基于相对于吸光度比的校准曲线进行换算而求出。

[0213] <试样>

[0214] 源自糖尿病患者的血球待测体(37待测体)

[0215] <校正用试样>

[0216] 市场销售市售的HbA1c校准品(爱科来社制)

[0217] <第一试剂>

[0218] 源自辣根的来过氧化物酶:15U/mL

[0219] 果糖基肽氧化酶(商品名FPO-302,东洋纺社制):3U/mL

[0220] 与第二试剂相同的磺基甜菜碱(各种):3g/L

[0221] PIPES缓冲剂(pH6.4)

[0222] <第二试剂>

[0223] 蛋白酶(商品名NEP-209,东洋纺社制):2U/mL

[0224] DA-67:45 μ mol/L

[0225] 磺基甜菜碱C12/C14(下述表3的浓度)

[0226] PIPES缓冲剂(pH6.8)

[0227] <测定方法1:血红蛋白浓度>

[0228] 测定主波长:596nm

- [0229] 测定次波长:694nm
- [0230] 待测体分注量:8 μ L
- [0231] 第一试剂分注量:96 μ L
- [0232] 第二试剂分注量:24 μ L
- [0233] 第一测光点:17-19
- [0234] <测定方法2:血红蛋白A1c浓度>
- [0235] 测定主波长:658nm
- [0236] 测定次波长:694nm
- [0237] 待测体分注量:8 μ L
- [0238] 第一试剂分注量:96 μ L
- [0239] 第二试剂分注量:24 μ L
- [0240] 第一测光点:21
- [0241] 第二测光点:40-42
- [0242] <测定方法3:HbA1c值(NGSP)的计算>
- [0243] 当将由测定方法1和测定方法2测定的血红蛋白浓度设为 C_{Hb} 、将血红蛋白A1c浓度设为 C_{HbA1c} 时,通过下述式来计算。
- [0244] $HbA1c = C_{HbA1c} / C_{Hb} \times 0.915 \times 100 + 2.15$
- [0245] 表3
- [0246]

| | | 浓度 g/L | 含量比 | 斜率 | Y切片 | 贡献率 |
|--------|---------------|-----------|------|-------|--------|-------|
| 实施例 13 | 磺基甜菜 碱 C12 | 1 | 66 | 0.981 | -0.045 | 0.993 |
| 实施例 14 | | 10 | 662 | 1.013 | -0.267 | 0.981 |
| 实施例 15 | | 20 | 1325 | 1.023 | -0.353 | 0.981 |
| 实施例 16 | | 30 | 1987 | 1.015 | -0.250 | 0.985 |
| 实施例 17 | 磺基甜菜 碱 C14 | 1 | 61 | 1.001 | -0.141 | 0.988 |
| 实施例 18 | | 10 | 611 | 1.016 | -0.256 | 0.991 |
| 实施例 19 | | 20 | 1222 | 1.032 | -0.235 | 0.995 |
| 实施例 20 | | 30 | 1834 | 1.052 | -0.303 | 0.993 |

- [0247] *含有量比:磺基甜菜碱的物质量/隐色型染料的物质量
- [0248] 如表3所示,针对相同待测体(37待测体),由市售的测定试剂盒进行的HbA1c值的测定值与由实施例13-20的稳定剂添加条件进行的HbA1c值的测定值之间的相关分析的结果示出了良好的相关性。
- [0249] [血红蛋白A1c(HbA1c)的测定2]
- [0250] 本实验为了表示即使在与上述不同的结构的试剂中也能够得到与上述相同的测定性能的情况而进行。其结果确认到下述构成的试剂具有与上述结构的试剂同等性能。
- [0251] <校正用试样>
- [0252] 市售的HbA1c校准品(爱科来社制)

- [0253] <第一试剂>
- [0254] DA-67:10 μ mol/L
- [0255] 蛋白酶(商品名NEP-209、东洋纺社制):8U/mL
- [0256] 磺基甜菜碱(C12或者C14):30g/L
- [0257] PIPES缓冲剂(pH6.8)
- [0258] <第二试剂>
- [0259] 源自辣根的过氧化物酶:60U/mL
- [0260] 果糖基肽氧化酶(商品名FPO-302、东洋纺社制):12U/mL
- [0261] PIPES缓冲剂(pH6.4)
- [0262] <测定方法1:血红蛋白浓度>
- [0263] 测定主波长:596nm
- [0264] 测定次波长:694nm
- [0265] 待测体分注量:8 μ L
- [0266] 第一试剂分注量:96 μ L
- [0267] 第二试剂分注量:24 μ L
- [0268] 第一测光点:17-19
- [0269] <测定方法2:血红蛋白A1c浓度>
- [0270] 测定主波长:658nm
- [0271] 测定次波长:694nm
- [0272] 待测体分注量:8 μ L
- [0273] 第一试剂分注量:96 μ L
- [0274] 第二试剂分注量:24 μ L
- [0275] 第一测光点:21
- [0276] 第二测光点:40-42
- [0277] <测定方法3:HbA1c值(NGSP)的计算>
- [0278] 当将由测定方法1和测定方法2测定的血红蛋白浓度设为 C_{Hb} 、将血红蛋白A1c浓度设为 C_{HbA1c} 时,通过下述式来计算。
- [0279]
$$HbA1c = C_{HbA1c} / C_{Hb} \times 0.915 \times 100 + 2.15$$
- [0280] [磺基甜菜碱的血红蛋白变性能以及蛋白酶反应促进能力的评价]
- [0281] 为了用酶法试剂测定HbA1c%,为了血红蛋白的精确的定量、且为了促进由蛋白酶进行的加水分解,优选使血红蛋白适当地变性。于是,针对磺基甜菜碱C12以及C14,为了评价Hb变性能以及蛋白酶反应促进能力,在下述条件下进行了本实验。
- [0282] <血红蛋白变性能的评价方法>
- [0283] 使用生化学自动分析装置(JCA-BM-6010,日本电子社制),在待测体分注后,观察直到第二试剂被分注为止的5分钟的血红蛋白的吸光度变化。测定结果如图3所示。
- [0284] <测定参数>
- [0285] 测定主波长:596nm
- [0286] 测定次波长:694nm
- [0287] 待测体分注量:8 μ L

- [0288] 第一试剂分注量:96 μ L
- [0289] 第二试剂分注量:24 μ L
- [0290] <试样>
- [0291] 将健康正常人的全血通过精制水稀释23倍的待测体
- [0292] <第一试剂>
- [0293] 源自辣根的过氧化物酶:15U/mL
- [0294] 果糖基肽氧化酶(商品名FP0-302、东洋纺社制):3U/mL
- [0295] 磺基甜菜碱(C12或14):3g/L
- [0296] PIPES缓冲剂:50mmol/L (pH6.4)
- [0297] <第二试剂>
- [0298] 蛋白酶(商品名NEP-209、东洋纺社制):2U/mL
- [0299] DA-67:45 μ mol/L
- [0300] 与第一试剂相同的磺基甜菜碱:3g/L
- [0301] PIPES缓冲剂:100mmol/L (pH6.8)
- [0302] <蛋白酶反应促进能力的评价方法>
- [0303] 使用生化学自动分析装置(JCA-BM-6010、日本电子社制)和使蛋白酶限速的测定试剂,在待测体分注后,观察直到第二试剂被分注为止的源自显色试剂的吸光度变化。测定结果如图4所示。
- [0304] <测定参数>
- [0305] 测定主波长:658nm
- [0306] 测定次波长:694nm
- [0307] 待测体分注量:8 μ L
- [0308] 第一试剂分注量:96 μ L
- [0309] 第二试剂分注量:24 μ L
- [0310] <试样>
- [0311] 将健康正常人的全血通过精制水稀释23倍的待测体
- [0312] <第一试剂>
- [0313] 源自辣根的过氧化物酶:15U/mL
- [0314] 果糖基肽氧化酶(商品名FP0-302,东洋纺社制):3U/mL
- [0315] 磺基甜菜碱(C12/C14):3g/L
- [0316] PIPES缓冲剂:50mmol/L (pH6.4)
- [0317] <第二试剂>
- [0318] 蛋白酶(商品名NEP-209,东洋纺社制):2U/mL
- [0319] DA-67:45 μ mol/L
- [0320] 与第一试剂相同的磺基甜菜碱:3g/L
- [0321] PIPES缓冲剂:100mmol/L (pH6.8)
- [0322] 如图3和图4所示,示出磺基甜菜碱C12和C14具有Hb变性能力和蛋白酶反应促进能力。

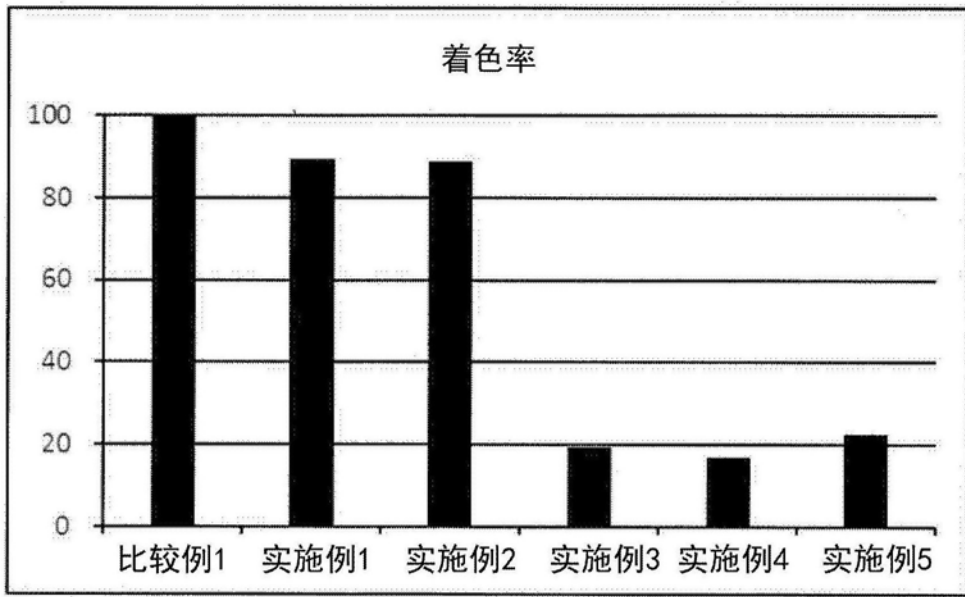


图1

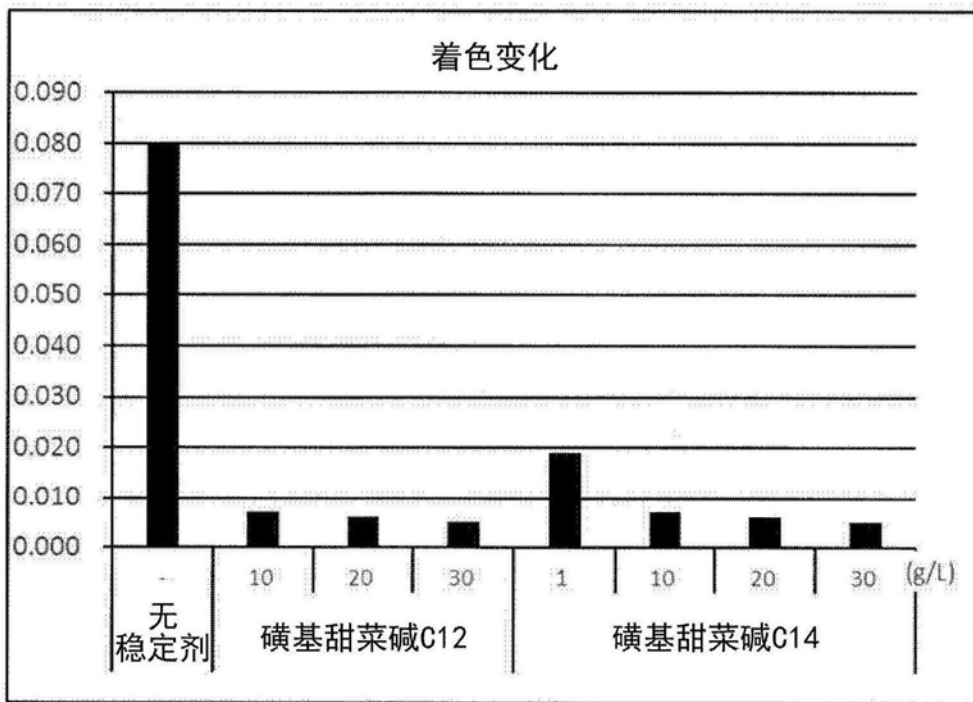


图2

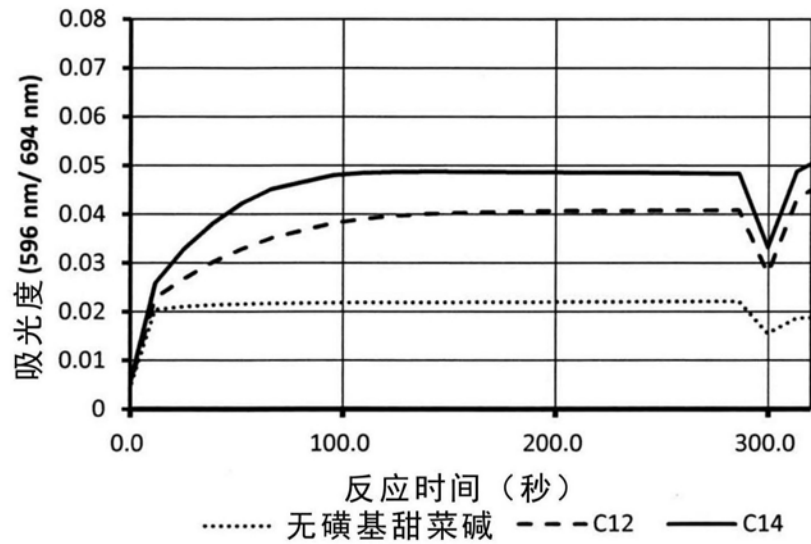


图3

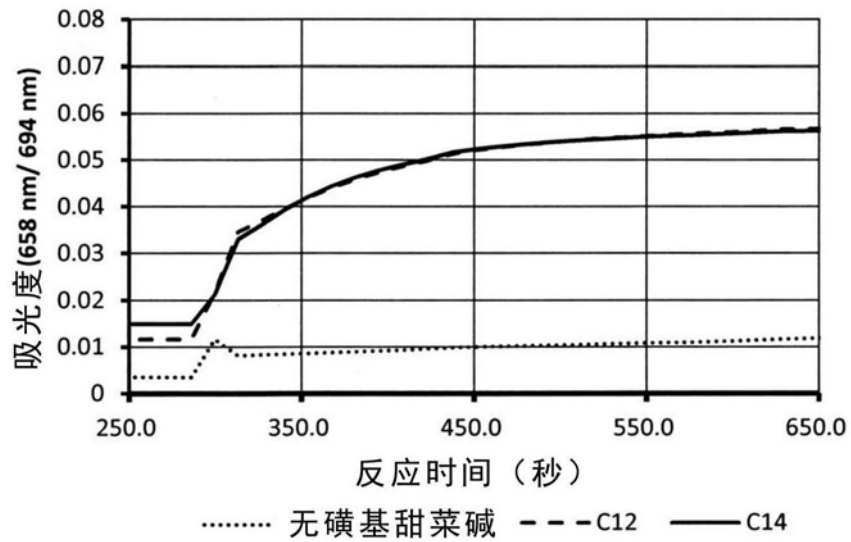


图4