

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/82 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410005542.4

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1322330C

[22] 申请日 1999.9.20

[21] 申请号 200410005542.4

分案原申请号 99811039.6

[30] 优先权

[32] 1998.9.18 [33] GB [31] 9820473.8

[73] 专利权人 爱克西斯 - 希尔德联合股份有限公司

地址 挪威奥斯陆

[72] 发明人 E·松德哈根 L·奥宁

[56] 参考文献

US4680273A 1987.7.14

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陶家蓉

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 2 页

[54] 发明名称

钴胺素的分析方法

[57] 摘要

本发明提供一种分析方法，用于测定身体样品中结合运钴胺素蛋白 II(TC II) 的钴胺素，包括使无细胞体液样品与固定的或可固定的 TC II 特异性结合配体或结合钴胺素的 TC II(holo TC II) 相接触，将配体结合组分与配体未结合组分相分开，并测定其中 holo - TC II 或 TC - II 结合的钴胺素含量。

1. 一种用于测定体液的无细胞样品中结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的分析方法, 其特征在于, 所述的方法包括使体液的无细胞样品与固定在可磁化颗粒上的运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的特异性结合配体接触, 通过施加磁场将结合配体的组分与未结合配体的组分分开, 和测定所述结合配体的组分中结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的含量。

2. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 其中进行的所述的配体结合组分与所述的配体未结合组分的分离, 至少使结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的浓度增加 3 倍。

3. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的分析能测定浓度低至 9pM 的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II。

4. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的特异性结合配体表现出对运钴胺素蛋白 II 的高度选择性和特异性, 并表现出对脱辅基或结合钴胺素形式的运钴胺素蛋白或其它结合钴胺素的蛋白质的低亲和性。

5. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的特异性结合配体选自: 多克隆或单克隆抗体、抗体片段、多肽、寡肽、DNA 或 RNA 的特异性结合序列、或细胞表面受体。

6. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述特异性结合配体是与运钴胺素蛋白 II 结合的单克隆抗体。

7. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 通过改变温度或 pH, 使所述的钴胺素从结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 分子中释放出来。

8. 如权利要求 7 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的释放出的钴胺素的测定, 是通过竞争性免疫分析方法进行的, 在带标记的钴胺素存在下, 将样品中分离出的钴胺素与固定化的钴胺素配体相结合, 所述带标记的钴胺素与分离出的钴胺素竞争性结合于所述的固定化的钴胺素配体上。

9. 如权利要求 8 所述的分析方法, 其特征在于, 所述标记的配体用可通过发光、化学发光、比色法、荧光、放射活性或酶活性测定的信号标记。

10. 如权利要求 8 所述的分析方法, 其特征在于, 所述标记的配体用可通过化学发光测定的信号标记。

11. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的运钴胺素蛋白 II 结合配体的亲和性常数至少为 10^9M^{-1} 。

12. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的运钴胺素蛋白 II 结合配体的亲和性常数大于 10^{11}M^{-1} 。

13. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 或运钴胺素蛋白 II 结合配体与咕啉的交叉反应性程度在 0.1% 和 1% 之间。

14. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 或运钴胺素蛋白 II 结合配体与咕啉的交叉反应性程度小于 0.1%。

15. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的体液的无细胞样品选自精液、脑脊液、羊膜水或从血液衍生的样品。

16. 如权利要求 15 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的从血液衍生的样品是血清或血浆。

17. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 该方法还包括分析校准步骤, 所述分析校准是用结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 标准品进行的。

18. 如权利要求 17 所述的分析方法, 其特征在于, 所述的标准品是人、天然或重组体结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II。

19. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述体液的无细胞样品是血清或血浆样品。

20. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述特异性结合配体是固定在可磁化颗粒上的运钴胺素蛋白 II 的单克隆抗体。

21. 如权利要求 1 所述的分析方法, 其特征在于, 所述测定所述的特异性结合配体的组分中结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的含量是通过:

通过改变周围介质中的 pH, 使所述的钴胺素从结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 分子中释放出来;

在带标记的配体存在下, 将释放出的钴胺素与固定化的钴胺素结合配体相接触, 所述带标记的配体与分离出的钴胺素竞争性结合于所述的固定化的钴胺素结合配体上。

22. 如权利要求 21 所述的分析方法, 其特征在于, 所述带标记的配体用可通过化学发光测定的信号标记。

钴胺素的分析方法

本申请是申请号为 99811039.6, 名为钴胺素的分析方法和试剂盒的分案申请。

技术领域

本发明涉及测定体液中钴胺素或维生素 B₁₂ 的分析方法, 具体地说是分析钴胺素代谢活性库的分析方法。

背景技术

钴胺素或维生素 B₁₂ 是一种水溶性维生素, 是食物中维生素 B 复合物的一部分。其核心分子由环绕基础钴原子的四个吡咯(pyrole)单元的咕啉环构成。钴胺素是唯一一种动物或植物不能合成的微生物, 必须在肠道中从食物吸收。其可存储在肝中。它由微生物尤其是厌氧细菌和酵母菌合成。

钴胺素在体内有辅酶的功能, 钴胺素酶催化三种类型的反应: (i)分子内的重排, 例如从 L-甲基丙二酸单酰辅酶 A 形成琥珀酰辅酶 A; (ii)甲基化, 例如通过甲基化高半胱氨酸形成甲硫氨酸和(iii)在一些微生物中将核糖核苷酸还原成脱氧核糖核苷酸。在哺乳动物中, 已知只有两种酶促反应, 就是上述(i)和(ii)中提到的, 需要钴胺素作为辅酶。

在消化过程中, 一种称为结合咕啉的唾液蛋白(在本领域中也称为 R-结合剂或转运钴胺素蛋白 I 和 II), 下文称为 HC, 在上消化道结合钴胺素形成可经过胃的复合物。在回肠中胰酶消化钴胺素-结合咕啉(holo-HC)复合物, 释放出的钴胺素随后与称为内因子的蛋白(由胃粘膜分泌)结合, 形成另一复合物。在回肠末端壁中钴胺素-内因子复合物与特异性受体结合, 其后被一释放因子分离, 钴胺素被主动传送通过回肠膜, 进入血流。

在身体中钴胺素不以显著量的游离形式循环。约 99%左右的钴胺素结合于一种转运钴胺素蛋白(TC-III)或白蛋白。

据信将钴胺素送递给靶组织的蛋白是运钴胺素蛋白 II(TC II), 一种关键的痕量蛋白, 没有它钴胺素就不能穿透细胞膜。除了这种重要代谢功能外, 血流中只有 6-25%的钴胺素结合于 TC II, 大部分钴胺素是由 HC 运输的。TC II 是一种 45kDa 的单链多肽, 主要见于血清、精液和脑脊髓液。结合于 TC II 或 holo-TC II 的钴胺素附着于细胞膜上的特异性受体, 而且一旦结合 holo-TC II 复合物就由胞饮作用进入细胞。

饮作用进入细胞。

TC II 由肝、脉管内皮、肠细胞、巨噬细胞和成纤维细胞合成，主要以 apo-TC II（即不结合钴胺素）循环。其半衰期很短，约 90 分钟。

总血浆钴胺素中至多 1/4 与 TC II 结合。其余的与上述其它运钴胺素蛋白或白蛋白结合。

由于钴胺素必须从食物中摄取，任何导致胃功能损伤的病症，例如胃肠炎或导致胃萎缩的病症，或不能产生结合咕啉、内因子、释放因子、TC II 或 TC II 受体，都可能导致钴胺素摄取受损和缺乏。

某些人群，如老人、孕妇、患慢性或急性胃肠炎患者、某些自身免疫疾病患者、有恶性贫血家族史的人和 AIDS 患者特别容易缺乏钴胺素。

钴胺素不足的临床表现多种多样，但主要包括贫血、巨成红细胞血症和神经系统功能结构紊乱。约 60% 诊断为钴胺素不足的人有贫血，但大部分观察到的临床信号只有神经症状。约 10% 患者有精神病症状，约 40% 患者有神经和精神症状。

早期诊断出钴胺素不足对确保患者良好预后非常重要，因为钴胺素缺乏的一些表现（尤其是神经精神作用）是不可逆的（若没有检测到），且用钴胺素治疗能很快减轻。

因此需要一种便利、有效的方法来精确地评估个体钴胺素水平，以确定个体是否患有钴胺素不足。

已用总血浆钴胺素（即与运钴胺素（TC）蛋白 I、II 和 III 任一结合的钴胺素及其类似物）的测定来评估钴胺素的不足。这种方法得到一宽的基础浓度分布（被视为在人群中是正常的），从而产生较宽的参考范围。然而在个体中，认为钴胺素的个体正常范围是非常窄的。已观察到，虽然当个体有代谢活性的钴胺素浓度超出其自身正常范围时，它们的总血浆钴胺素含量依旧认为在人群的正常范围中。这种情况下，就不能检测出钴胺素的不足。显然这种不可靠的方法是不理想的，且认为这种血清或血浆分析方法的诊断灵敏性和特异性均很低。

已开发和使用依赖于钴胺素生长的微生物的微生物分析方法，来测定血浆钴胺素浓度，但除了确定恰当参考范围有困难外，这些方法需要提取和转化钴胺素，这既耗时麻烦又不适于快速实验室筛选。

其它钴胺素不足的分析方法包括测定血浆中需要钴胺素进行转变的代谢物的累积。在钴胺素不足个体的血浆中丙二酸二甲酯和血浆高半胱氨酸的水平升高 (Chanarin, 巨成红细胞贫血(The megaloblastic anaemia); London, Blackwell Scientific Publications, 1991), 而且使与维生素 B₁₂ 相关的良性候选分子不足。已表明基于高

半胱氨酸评估的方法是复杂而不实用的,而且精确性和灵敏性也很差。而基于丙二酸二甲酯测定的方法是精确而可靠的,但非常笨重而且还需要结合气相层析/质谱分析的分析手段,因此价格昂贵也不适于常规的临床筛选(Nexo等人(1994) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 54:61-76)。

已有人建议用 TC II 结合的钴胺素测定来替代血浆总钴胺素测定,其能提供钴胺素不足可能性的可靠临床指示(Herbert 等人,(1990) Am. J. Hematol. 34:132-139; Wickramasinghe 和 Fida(1993) J. Clin. Pathol. 46:537-539; 美国专利 4680273)。然而这种测定 holo-TC II 浓度的方法必须计算,不是直接得到的(计算血浆总钴胺素与 TC II 去除后血浆钴胺素浓度之间的差异,评估 holo-TC II 浓度)。

可用硫酸铵(Carmel(1974) Am. J. Clin. Pathol. 62:367-372)、微硅(microsilica)(Herzlich & Hubert(1988) Lab. Invest. 58:332-337; Wickramasinghe & Fida(1993) J. Clin. Pathol. 46:537-539)、微型细玻璃(Vu 等人(1993) Am. J. Hematol. 42:202-211)或固定的抗 TC II 多克隆抗体(Lindemans 等人(1983) Clin. Chim. Acta 132:53-61)吸收来去除这种 TC II。总血浆和去除部分中钴胺素的浓度可用本领域熟知的方法来测定,如放射和酶免疫分析方法。由于这些方法复杂而费时,它们不适于自动化或非自动化常规筛选,而且还因为所用吸收材料的特异性程度低,导致不能充分分离 holo-TC II 和 holo-HC,造成对 holo-TC II 评估过高。吸附材料批与批之间的差异也将引入其它误差,最重要的是从一大容积减去另一大容积会导致不能接受的不精确性和不可靠性。

另一评估 TC II 的方法涉及利用其亲油性将 TC II 与其它血清成分(包括 TC I 和 TC III)分离。因此 Kapel 等人(1988) Clin. Chim. Acta 172:297-310, Benhayoun 等人(1988) Acta Haematol. 89:195-199 和 Toft 等人(1994) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 54:62 分别公开了用肝素琼脂糖、硅胶或纤维素将 TC II 与其它运钴胺素蛋白分离的方法。然而由于它们依靠相同的吸附材料,这些方法也与间接方法有相同的缺点。而且由于 holo-TC II 的低血浆浓度,使这些方法不适合于与已有的钴胺素定量方法联合。holo-TC II 的正常范围为 35-160pM,低于 35pM 的测定值通常被认为表明钴胺素不足。大部分血浆钴胺素常规方法报道的分析灵敏度约为 40pM,但实际上常常高得多,典型地约为 90pM。因此,血浆 holo-TC II 的正常水平低于或接近钴胺素定量常规方法的灵敏度界限。

当前认可的可能是最精确的测定 TC II 结合钴胺素的方法,包括用硅吸附 TC II,然后用免疫分析方法(Kuemmerle 等人(1992) Clin. Chem. 38/10:2073-2077)或用微生物分析方法(后者能明显产生最好的结果)分析结合组分中钴胺素的含量。

这种方法要求在整个工作日中仅进行 20 次分析。这种方法非常昂贵且不实际，也不太适用于常规临床诊断实验室的研究。

因此迫切需要改进测定体液中有代谢活性的钴胺素水平的方法，鉴于钴胺素不足的可能性与钴胺素水平相关，该方法应能适用于常规临床诊断应用。

发明内容

所以，本发明第一方面提供了一种用于测定体液的无细胞样品中结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的分析方法，包括使体液的无细胞样品与选择性结合于脱辅基形式的运钴胺素蛋白 II 和结合咕啉的固定化钴胺素或其相似物或片段接触，从而将运钴胺素蛋白 II 的脱辅基形式和结合咕啉与结合钴胺素的形式分开，或抑制运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的特异性结合配体随后识别运钴胺素蛋白 II 的脱辅基形式和结合咕啉，随后使所述的样品与固定的或可固定的运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 运钴胺素蛋白接触，将结合配体的组分与未结合配体的组分分开，和测定其中的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的含量。在该方面的一个实施例中，进行了所述的配体结合组分与所述的配体未结合组分的分离，从而至少使结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的浓度增加 3 倍。

在该方面的一个实施例中，该分析能测定浓度低至 9pM 的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II。

在该方面的一个实施例中，特异性结合配体选自：多克隆或单克隆抗体、抗体片段、多肽、寡肽、小有机化学物、DNA 或 RNA 的特异性结合序列、或细胞表面受体。

在该方面的一个实施例中，这些特异性结合配体表现出对运钴胺素蛋白 II 的高度选择性和特异性，并表现出对其它脱辅基或结合钴胺素的形式运钴胺素蛋白质或其它结合钴胺素的蛋白质的低亲和性。

在该方面的一个实施例中，通过改变温度或 pH，使所述的钴胺素从结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 分子中释放出来。优选释放出的钴胺素的测定，是通过竞争性免疫分析方法进行的，将样品中分离出的钴胺素与固定于某一支持物的钴胺素配体相结合，并加入带标记的钴胺素，所述带标记的钴胺素与分离出的钴胺素竞争性结合于所述的固定化的钴胺素配体上。

在该方面的一个实施例中，分析方法还包括将其上固定有运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 结合配体的固相支持物，与待研究的样品和非固定的配体接触；

其中所述的固定化配体能结合于运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II、所述的非固定化配体或所述运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 与非固定化配体的复合物；以及所述的非固定化配体能结合于至少一种所述的固定化配体、运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 和所述的固定化配体与运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的复合物；

其中如果所述的分析方法是夹心分析的话，至少一种所述的配体对结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 是特异性的，如果所述的分析是竞争分析，则所述的固定化配体对结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 和其竞争者是特异性的；

被运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II、所述的非固定化配体、或所述的非固定化配体与运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的复合物结合的所述的固定化配体的比例，取决于所述样品中存在的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的量；和

当结合或未结合时，所述的非固定化配体能产生可直接或间接检测的信号；

将结合的组分与未结合的组分分开；和

直接或间接测定结合于固定化配体的非固定化配体，即结合组分，或未结合于固定化配体并在溶液中的非固定化配体，即未结合组分；

其中可分开、同时或顺序进行样品和所述的非固定化配体与固相支持物的接触，而且如果是分开或顺序进行的，它们可以任何顺序接触。

在该方面的一个实施例中，运钴胺素蛋白 II 结合配体的亲和性常数至少为 10^9M^{-1} ，优选大于 10^{11}M^{-1} 。

在该方面的一个实施例中，结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 或运钴胺素蛋白 II 结合配体与咕啉的交叉反应性程度在 0.1% 和 1% 之间。

在该方面的另一个实施例中，结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 或运钴胺素蛋白 II 结合配体与咕啉的交叉反应性程度小于 0.1%。

在该方面的一个实施例中，使含结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 复合物的样品与固相接触，该固相上结合有带标记的配体，该配体能够识别固定化配体与结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 相结合位点；所述样品中的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 与所述带标记的配体竞争性结合所述的结合位点，从而在该系统平衡后，从所述的固相支持物置换出的带标记的配体的量和溶液中可检测的带标记的配体的量以及初始样品中存在的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的量之间存在直接的比例关

系；通过测定结合于或未结合于所述固相支持物的带标记的配体的量，来直接或间接检测带标记的配体。

在该方面的一个实施例中，结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 含量的测定是通过使含结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的样品与其上固定有结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的固相支持物和带标记的、非固定化结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 特异性结合物接触，样品中游离的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 和固定化结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 竞争结合于带标记的非固定化配体；和测定结合于固相和残留在溶液中的带标记的配体，从而确定结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的浓度。

在该方面的一个实施例中，结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 含量的测定是通过使含结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的样品与带标记的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 和固定化配体接触，所述的带标记的和不带标记的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 复合物竞争结合于固定化配体，达到平衡后，结合于固定化配体的带标记的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的量与样品中结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 量呈比例关系。

在该方面的分析方法中，体液的无细胞样品选自精液、脑脊液、羊膜水或从血液衍生的样品。

在该方面的一个实施例中，从血液衍生的样品是血清或血浆。

在该方面的一个实施例中，结合组分通过沉淀、离心、过滤或层析方法，与所述的未结合组分分开。

在该方面的一个实施例中，可检测配体标记有可用发光、化学发光、比色法、荧光、放射活性或酶活性测定的信号标记。

在该方面的一个实施例中，分析校准是用结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 标准品进行的。这些标准品是人、天然或重组体结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II。

本发明的第二个方面是一种用于上述分析方法的试剂盒，包括：

选择性结合于脱辅基形式运钴胺素蛋白 II 和结合咕啉的固定的钴胺素或其相似物或片段；

固定的或可固定的运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的特异性结合配体。

在该方面的一个实施例中，该试剂盒还包括结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 溶

液。

在该方面的另一个实施例中，该试剂盒还含有用于使结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 释放钴胺素的 pH 调节剂。

在该方面的还有一个实施例中，该试剂盒还含有运钴胺素蛋白 II 或结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的标记过的特异性结合配体，其中所述标记过的配体可用发光、化学发光、比色法、荧光、放射活性或酶活性检测。

本发明的第三个方面是结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II 的用途，用预定浓度的结合钴胺素的运钴胺素蛋白 II，在本发明第一方面的分析方法中，作为体液的无细胞样品中钴胺素结合的运钴胺素蛋白 II 分析的校准剂。

特异性结合配体指一种凭借其特异性化学结构或构象（而不是简单地凭借一般的物理—化学特性，如亲油性，其可能对体液样品中的许多成分是共同的）结合于 TC II（即 apo—TC II 和 holo—TC II）或 holo TC II 的配体。适用于本方法的配体的结合亲和性或特异性宜使样品中 TC II 或 holo—TC II 浓缩 3 倍，较佳的是 5 倍，更佳的是 10 倍，最佳的是大于 10 倍，因此这种方法在 holo—TC II 低于正常范围以及在亚正常范围时，能提供精确的和可靠的 holo—TC II 值。这种靶分子的分离和浓缩在现有方法（不能从 HC 或 holo—HC 中有效分离 TC II 或 holo—TC）中是不可能办到的。若能将 TC II 或 holo—TC II 浓缩至少 3 倍使得在进行分析时可用自动化分析装置。若无这种浓缩步骤，样品中存在的分析物的浓度可能低于检测下限。这些自动分析装置操作时通常要求 150 μ l 或以上总容积中样品为 40—100 μ l。因此，分析时低浓度的分析物甚至会被进一步稀释。然而用本发明的分析方法，可将分析物至少浓缩 3 倍。通常用这种自动分析装置的控制范围为 100—700pM，灵敏度的下限约为 40pM，但实际下限约为 90pM，5 倍浓缩有利于测定低至 18pM 的 holo—TC II，而 10 倍浓缩有利于测定低至 9pM 的 holo—TC II。由于本发明有利于 10 倍以上的浓缩，技术人员易于理解灵敏度程度的提高使这种方法成为一种非常有效的技术。

浓缩分析物的能力使得可用这些自动化步骤进行分析，这是本发明分析方法的一个重要优点。

浓缩宜从 600 μ l 体液样品开始，得到 150 μ l、较佳的是得到 100 μ l、更佳的是得到 60 μ l 以下用于分析（可任选地用自动步骤）的体积。

可在本发明的方法中采用任何 TC II 特异性结合配体，作为捕获、浓缩和分

离配体或检测配体,并按本发明具体实施例可以脱辅基和 holo 两种形式结合于 TC II,或可将其特异地或择优地结合于 holo 形式。TC II 结合配体较佳地将表现出对 TC II 的高度选择性和特异性,并且对其它 TC 蛋白质(即脱辅基或 holo 形式的 TC I 或 III)或任何其它钴胺素结合蛋白表现低亲和性或较佳地基本无亲和性。如果 TC II 结合配体是 holo-TC II 特异性结合配体,将表现出相同的特性,而且其它要求为对脱辅基 TC II 的低亲和性或较佳地基本无亲和性。

TC II 或 holo-TC II 结合配体通常分别为对 TC II 或 holo-TC II 有亲和性的其它结合配体可以是 DNA 或 RNA 的特异性结合序列。

如果结合配体是抗体,其可以是多克隆的,但较佳的是单克隆的。可产生比多克隆抗体具有更大亲和性和均一性的单克隆抗体,从而降低了与体液中其它成分(尤其是其它运钴胺素蛋白和其它适合的构象,即靶分析物的脱辅基形式)的交叉反应性。单克隆抗体提供较多克隆抗体更好的均一性和再现性,确保了更好的精确度,这对分析如此低浓度的分析物而言是非常重要的。另外,也可以是例如 F(ab)、F(ab')₂ 或 F(v)片段等抗体片段。抗体或抗体片段可以是单价或二价的,可通过杂交瘤技术产生或是合成来源,用重组 DNA 技术或化学合成生成。可用例如单链抗体或其它抗体衍生物或模拟物。抗体可针对合适的 TC II 或 holo-TC II 蛋白的任一表位、组分或结构。

Quadros 等人(1996)Biochem. Biophys. Res. Commun. 222:149-154; M Lean 等人(1997)Blood 89(1):235-242 中公开了可用于本发明结合配体的适合抗体。

可类似地采用能结合 TC II 脱辅基和 holo 形式或择优地或特异性结合 holo-TC II 形式的受体分子。适合的受体是细胞表面或膜结合 TC II 或 holo-TC II 受体,种交叉反应性指这些受体分子来自任何种类哺乳动物,但这些受体来源较佳的是人或牛。虽然较佳的是以相对纯化形式分离的受体分子,也可考虑采用浓缩形式的含受体的细胞膜或混合的膜组分。这些受体或含受体的膜或膜组分较佳地可从肾、胎盘或肿瘤细胞分离获得。沉淀细胞通常不能作为受体的来源。但沉淀细胞可作为结合咕啉的受体来源。

如 Seligman 等人, J. Biol. Chem. 253:1766-1772(1978)和 Nexo 等人, Biochem. Biophys. Act. 628:190-200(1980)所述,可得到富含 TC-II 受体的膜组分。通常将组织(如人胎盘或兔肝)切成小片,在三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH 7.4, 含 0.15M NaCl 和 10mM EDTA)中匀浆化,随后 25,000×g 离心 30 分钟。为除去残留的

血液，至少重复一次匀浆化/离心。进一步用去污剂（如 Ammonyx-LO、Triton X-100 或 Chapso）提取这种膜组分，4℃100,000×g 离心 30 分钟澄清。将上清液作为 TC-II 受体的来源。

适合的择优结合 holo-TC II 复合物的受体分子的例子是 62kDa 单链糖蛋白，其作为非共价同型二聚体存在，见于所有组织的细胞膜上(Rothenberg & Quadros (1996) *Balliere's Clinical Haematology* 8(3)499-514; WO 96/085150)。另一个适用于本发明分析方法的蛋白质是 gp300，它是一种 600kDa 介导胞吞作用的膜蛋白，在吸收性上皮细胞中表达，如 Moestrup 等人(1996)*Proceedings National Academy Science* 93:8612-8617 中所公开和描述的肾近端小管细胞。这种受体是 LDL 受体，能结合脱辅基和 holo 两种形式的 TC II。

当用细胞表面受体时，可通过偶联将其固定在一表面，如玻珠或薄板，或可将含受体的细胞膜组分制成能发挥受体作用的小泡或薄板。

当配体被固定时，例如在固体的表面，如滤膜或薄板的表面或管腔内，但特别优选的是固定在微粒上，如微球上（例如 Dyno Industrier ASA, Norway 生产的）。这些微粒是多孔的或无孔的，而且如果需要可以，例如通过用磁性反应性材料（如超顺磁性氧化铁晶体）收集这些微粒。这些磁性反应性微玻珠可从 Dyno Industrier ASA 和 Dynal AS, Norway Bang Particles, USA 和 Prolabo, France 购得。相对于固定的配体而言，当欲固定配体时，在实施本发明的方法中可将配体偶联于特异性结合对（如生物素/链霉亲和素）的一成员，并且将该结合对的另一成员任选地结合于底物、团粒，或从未结合的组分分离出结合配体的成分前，将配体或配体：TC II 或配体：holo-TC II 复合物固定。

本领域熟知固定亲和性分子，如用于分离的抗体或抗体片段，例如任选地通过接头将配体结合于或偶联于任何熟知的固相支持物或基质（已广泛用于柱上的分离或固定），而且还可用本领域任何已知的方法。这些固相可以采取颗粒、薄板、凝胶、滤纸、膜、纤维或毛细管或微量滴定槽、管或孔板形式，通常可用玻璃、硅、胶乳或聚合物制成。将配体结合到固相支持物的方法是本领域熟知和文献中有广泛描述。

可用常规方法将配体偶联于底物或特异性结合对的一个成员。

如果该分析是作为竞争性结合分析进行的，本发明的方法通常包括在样品中加入一标记的化合物，它竞争结合该配体。通常，在这一方面优选采用标记的 holo-TC II。所用的标记可以是任何能直接或间接检测出的标记，如生色团（该术语包括荧光团）、放射性标记（通常共价结合或螯合）、酶或酶的底物、磁性标记

等。

一优选实例是，本发明的方法包括使固定的或可固定的 TC II 或 holo-TC II 结合配体与研究的样品接触；将配体结合的组分与未结合配体的组分分开；将结合组分中结合的钴胺素与 holo-TC II 分子分离，较佳地通过分离释放的钴胺素的浓度至少为初始样品中 holo-TC II 浓度的 3 倍，较佳地为 5 倍和更佳地为 10 倍。

本发明这方面的含义是 TC II 或 holo-TC II 的分离和浓缩，从而使得在该方法中可采用钴胺素检测的标准方法。如上所述，无这种浓缩步骤时，本领域的分级步骤不适合于钴胺素的测定，因为钴胺素存在的量太低。可采用任何适合的方法从 holo-TC II 中释放钴胺素，但通常可采用加热或改变周围介质的 pH。用 KCN 处理可将不同形式的钴胺素转化成光敏感性较弱的维生素 B₁₂。在本发明的方法中可用任何适合的游离钴胺素测定的方法，例如通过在存在带标记的配体（与分离的钴胺素竞争结合于固定的结合伴侣）时，使固定的钴胺素结合伴侣与样品中分离的钴胺素接触进行竞争分析。Kuemmerk 等人(1992) Clin. Chem 38:2073-2077 中举例描述的方法就是适合的。美国专利 No.5451508 中公开了另一测定游离钴胺素的方法，其包括一种免疫分析技术。

在本发明的一实例中，优选固定 TC II 结合配体，并结合于 holo 和脱辅基 TC II。

在另一优选实例中，本发明的分析方法包括使带固定 TC II 或 holo-TC II 结合配体的固相支持物与待研究的样品和非固定的配体接触，

所述的固定化配体能结合于 TC II 或 holo-TC II、所述的非固定化配体、或所述的 TC II 或 holo-TC II 与所述的非固定化配体的复合物，而且所述的非固定化的配体能结合于至少一个所述的固定化配体、TC II 或 holo-TC II、以及所述的固定化配体与 TC II 或 holo-TC II 的复合物；

如果所述的分析方法是一种夹心分析，至少一种所述的配体对 holo-TC II 是特异性的，如果所述的分析是竞争性分析，则所述的固定化配体对 holo-TC II 和其竞争者是特异性的；

因此被 TC II 或 holo-TC II、所述的非固定化配体、或所述的非固定化配体与 TC II 或 holo-TC II 的复合物结合的所述的固定化配体的比例，取决于所述的样品中存在的 holo-TC II 的量，和

当结合或未结合时，所述的非固定化配体能直接或间接产生可检测的信号；

将结合组分与未结合组分分开；和

直接或间接测定结合于固定化配体的非固定化配体，即结合组分，或未结合

于固定化配体并在溶液中的非固定化配体，即未结合组分；

可分开、同时或顺序进行样品和所述的非固定化配体与固相支持物的接触，如果是分开或顺序进行的，它们可以任一顺序进行接触。

本发明方法的其它优选实例包括测定非固定的配体，其直接或间接结合或任选地不能直接或间接结合于固定的配体。当非固定的配体与 holo-TC II 竞争结合于固定的配体时，未结合的非固定配体的高水平表明样品中 holo-TC II 的高浓度，未结合的非固定配体的低水平则表明样品中 holo-TC II 的低浓度。当非固定的配体结合于 TC II 或 holo-TC II（其进而结合于固定的配体）时，结合的非固定配体的高水平表明样品中 holo-TC II 的高浓度，而结合的非固定配体的低水平则表明样品中 holo-TC II 的低浓度。

在本发明的方法中，通过测定含有脱辅基和 holo-TC II 以及脱辅基和 holo-HC（结合咕啉或 TC I 和 III）二者的身体样品中存在的 holo-TC II 复合物，或结合于 TC II 分子的钴胺素的量，来确定钴胺素的代谢活性库。

可用固定的钴胺素或模拟物或其片段（能选择性结合于脱辅基形式的 TC II 和结合咕啉(HC)）进行初步的分离步骤。在这种初步步骤中，用固定钴胺素、模拟物或其片段结合脱辅基形式的 TC II 和 HC 蛋白质，并将其从 holo-TC II 和 holo-HC 复合物中分离出来。

在这种实验中，然后按本发明的任一实例所述进行分离的 holo 形式的 TC II 的分析，但显然，通过不解离复合物的方法进行 holo-TC II 复合物的测定，再测定释放的钴胺素是最有用的。对技术人员而言显然的是，如果初步步骤进行上述的备选优选实施例时，夹心分析中需要至少一种对 holo-TC II（而不是对 holo-TC II）的特异性配体，这和竞争分析中需要至少一种对 holo-TC II 及其竞争者（而不是对 TC II）的特异性配体的需求已不再相关，因为脱辅基形式的 TC II 已被捕获，不再存在了。因此，固定的或非固定的配体对 holo-TC II 或 TC II 或其竞争者可以是特异性的。

固定的钴胺素应不表现出任何明显的与其支持物分离的倾向，因为这可能导致与脱辅基-TC II 结合并将其转化成 holo-TC II。生物素酰化的钴胺素以非常稳定方式结合于其上带有亲和素（avidin）/链霉亲和素的固体表面，以这种方法将钴胺素限制在支持物上便于进行该步骤。事实上，当采用生物素酰化钴胺素时，可以非固定的形式加入到分析的样品中，其结合于脱辅基形式的 TC II 和 HC。然后使样品与其上固定有生物素的结合伴侣（如亲和素）的固体表面接触。然后形成的亲和素-生物素酰化钴胺素-TC II 的复合物易于从样品中分离出来。

在本发明的实施初步分离步骤的一个实例中，通过使样品与固定化 TC II 配体（其捕获 holo-TC II 复合物，在溶液中留下结合咕啉）接触，然后使被固定的 holo-TC II 与第二 TC II 配体（带标记，因此可探测）接触，随后测定 holo-TC II 库。适合的 TC II 结合配体的例子是不重叠的单克隆抗体，或真正的 TC II 的特异性多克隆抗体也适用于此捕获和检测实例，因为可识别 TC II 分子上不同的表位。

在本发明的另一进行初步分离步骤的实例中，holo-TC II 分子与带标记的非固定配体竞争结合于固定的配体，因此可由带标记的非固定配体结合于或没有结合于固定配体的量来计算 holo-TC II 的量。

在本发明的初步分离步骤的一优选实例中，脱辅基 TC II 和脱辅基 HC 结合于钴胺素、模拟物或其片段发生在某一位点上，或以抑制后续的 TC II 的非固定配体或结合伴侣对固定的结合钴胺素的识别和结合的方式发生。在该实例中，在进行本发明的分析前，无需从结合的脱辅基形式分离出 holo-TC II 和 holo-HC。在该实例中，非固定结合伴侣或配体针对的位点非常重要，应该是当脱辅基 TC II 和脱辅基 HC 在钴胺素、模拟物或其片段上固定时，TC II 上被掩蔽或屏蔽或其它不可能接近的表位。

初步分离步骤是否包括采用 TC II 的结合配体或总分离（即从样品中分离出所有脱辅基和 holo TC II 蛋白质）之前是否采用固定化钴胺素、模拟物或其片段进行初步步骤，不是本方法的需要，且其能满足从至少含有一部分所需蛋白质 TC II 亚组的样品中分离出某成分。

因此在一些实例中，选择结合伴侣或配体及结合条件，以完成所有选定的“亚组”的后续分离。在这种情况下，未结合组分可视为基本无 TC II 或 holo-TC II 蛋白质，即至少 80%、90% 或 95% 无 TC II 或 holo-TC II，取决于选择何种成分为组分分离的基础。

在其它实例中，选择结合伴侣和结合条件使得样品中只有 TC II 蛋白的一部分被分离到一组分中。在这种情况下，应以部分分离来计算建立该分析的标准校准曲线。在在这点上，可用本领域熟知的标准方法确定产生检测 holo-TC II 浓度的标准校准曲线。

因此，如果在组分分离步骤中采用 TC II 结合配体，至少一部分结合 TC II 的钴胺素将在结合组分中，样品中结合于分子（如 HC 或白蛋白）而非 TC II 的钴胺素将在未结合组分中（即未分离的组分）。结合组分中的 TC II 可以是脱辅基和 holo 形式，而且还可以与钴胺素以外的类钴胺素物质或模拟物复合。

如果需要，本发明的方法还可包括一初步分离步骤，其中使样品与固定的或

可固定的结合咕啉（脱辅基和 holo 形式或仅 holo/形式）的特异性结合配体接触。在该方法中，可减少 holo-HC 衍生的结合 TC II 的钴胺素测定中的错误影响，而且可采用 TC II 或 holo-TC II 的特异性结合配体（对结合咕啉有一些结合亲和力）。

另外，如上所述由于血清中脱辅基和 holo 形式的 TC II 浓度非常低，在本发明的操作中具有特别高特异性和亲和性的配体或结合伴侣是必须的。同样，本发明配体所需的亲和性常数取决于该配体是否对 TC II 或 holo-TC II 的特异性，而且也可将其用作捕获或检测配体，因为 TC II 的血清浓度约为 0.5-1nM，而 holo-TC II 的血清浓度仅为 35-160pM。所以，TC II 捕获配体的亲和力常数至少为 10^9M^{-1} ，较佳地为 $2 \times 10^9\text{M}^{-1}$ 以上，更佳地为 10^{10}M^{-1} 才理想。对于 holo-TC II 捕获配体，亲和力常数至少为 10^{10}M^{-1} ，较佳地是 $2 \times 10^{10}\text{M}^{-1}$ 以上，更佳地是 10^{11}M^{-1} 以上才理想。显然，由于分析中的浓度影响，检测结合剂所需的亲和力常数可小于捕获配体的。

holo-TC II 或 TC II 结合配体与 HC 的交叉反应性程度应小于 1%，较佳地为 0.1%-1% 之间，最佳地小于 0.1%。类似地，holo-TC II 结合配体表现出的与脱辅基 TC II 的交叉反应性宜为不超过 1%，较佳地应在 0.1%-1% 之间，更佳地它们的交叉反应性应小于 0.1%。

通过使用这种高亲和性的配体，它们的功能超过了单纯的捕获和/或检测配体，在从分析样品中分离和浓缩 TC II 蛋白质中它们起了至关重要的作用。TC II 或 holo-TC II 结合配体应将配体至少浓缩 3 倍，较佳地为 5 倍，更佳地为至少 10 倍。

在另一替换分析而不是竞争分析的分析技术实例中，将含 holo-TC II 复合物的样品与一固相接触，该固相上结合有能识别固定化配体（如 holo-TC II）上的相同结合位点的带标记的配体。样品中的 holo-TC II 与结合的带标记的配体竞争位点，从而在系统平衡后从固相支持物置换出的带标记配体的量和溶液中可检测的量以及初始样品中存在的 holo-TC II 的量之间有一直接的正比例关系。可直接或间接测定带标记的配体，而且可以结合于或未结合于固相支持物的带标记配体量确定。实际上，在该实例中先前非固定化的配体在加入样品前与固定的配体结合，但这种结合并不意味着该配体以任何形式被固定。

另一优选实例涉及将含 holo-TC II 的样品与其上固定有 holo-TC II 的固相支持物和带标记的非固定 holo-TC II 特异性结合剂接触。样品中游离的 holo-TC II 和固定的 holo-TC II 与带标记的非固定配体竞争结合，测定与固相结合的或

溶液中残留的带标记的配体，可计算 holo-TC II 的浓度。在本发明一特别优选的实例中，带标记的非固定 holo-TC II 结合配体是一种抗体。

在另一实例中，将含感兴趣分析物的样品与带标记的 holo-TC II 和固定的配体接触。带标记的和不带标记的 holo-TC II 竞争结合于固定化配体，达到平衡后，结合于固定化配体的带标记的 holo-TC II 的量与感兴趣样品中 holo-TC II 的量呈间接正比例。另外，可直接或间接测定带标记 holo-TC II，而且可测定结合于或未结合于固相支持物的带标记 holo-TC II 的量。

在本发明的另一实例中，将 holo-TC II 复合物特异性的非固定的但为可固定的配体（如，与生物素或特异性结合对的另一成员偶联的配体）与样品接触，形成 holo-TC II/非固定配体复合物。然后可用已知的方法从溶液中将配体/holo-TC II 复合物沉淀下来分离后作分析。

在本发明的另一实例中，将两种带标记的结合伴侣加入到样品中（任选在初步步骤后，如除去样品中脱辅基形式的 TC II 和 HC）。在该实例中，结合伴侣是带标记的 holo-TC II 或其模拟物或片段和其带标记的结合伴侣，如带标记的抗体。在该实例中，仅在标记彼此密切接近时（即两种带标记的结合伴侣彼此结合时），标记才产生可检测的信号。因此，当加入到样品中时，holo-TC II 的带标记的结合伴侣与样品中不带标记的 holo-TC II 结合（不产生可检测的信号），或与带标记的 holo-TC II 或其模拟物、片段或与带标记的 TC II 结合伴侣结合的变体结合（产生可检测的信号）。标记试剂，如 Amersham 闪烁接近分析中所用的（如美国专利 No.4568649 中所述），适合用于本实例，而且这种方法的高灵敏度非常适合这种分析物以低浓度存在的分析。因此，例如当结合对的一个成员是用 β -发射核子（如 I^{125} 或 H^3 ）标记时，另一成员则用适合的闪烁分子标记。发射的 β 粒子在水环境中丧失其能量，除非闪烁体在 $1.5\mu m$ 以内并要求两带标记的伴侣彼此结合，产生检测的信号。这两种带标记的伴侣彼此结合的概率可用样品中存在的 holo-TC II 的浓度来确定，产生的信号越大，样品中 holo-TC II 的浓度越低。

如本文所述，术语“测定”或“评估”包括样品中结合 holo-TC II 或 TC II 的钴胺素的量或浓度的绝对值的定量，和半定量和定量评估或测定。也可得到结合于 TC II 的钴胺素的水平或量的指数、比例、百分比或类似指标（如相对于总钴胺素）。

用于本发明分析方法的身体样品可以是任何含钴胺素的样品，如体液或组织样品，或悬浮液等。较佳地，样品是身体样品，如精液、脑脊髓液或羊膜水，但通常为从血液衍生的样品。在这种情况下，用于分析的样品较佳地为无细胞的，

血清或血浆。在用于本发明的分析方法前，可先处理样品，例如添加缓冲液或其它水性介质进行稀释和存储或保藏，例如在分析前预冷或冷冻。

在本发明的实践中，可用适当的方法从未结合组分中分离出结合组分，如沉淀、离心、过滤、层析方法等。

为避免疑问，术语“钴胺素”与本文所用的“维生素 B₁₂”同义，包括体内存在的和有代谢活性的（当适当存在时）所有形式的维生素 B₁₂（维生素 B₁₂、5-6-二甲基-苯并咪唑基维生素 B₁₂、甲基钴胺素、5'-脱氧酰苷钴胺素）。

如上所述在本发明的方法中，结合 TC 的钴胺素可通过检测结合于分离的 holo-TC II 的配体进行测定，或用 holo-TC II 的带标记的竞争者作竞争分析来测定，其中 holo-TC II 与带标记的竞争者竞争结合于结合配体；或通过检测自分离的 holo-TC II 释放出的钴胺素来测定。

可用任何常规的方法常规标记可检测的配体，例如用产生信号的标记物标记，该标记可用例如发光、化学发光、比色评估、荧光、放射活性或酶活性来测定。事实上，本发明的方法中可采用本领域已知的任何产生信号的标记物。

仅作举例用，本发明中可用于标记可检测结合配体的产色或荧光化合物的适当例子为，葱醌、偶氮染料、吡嗪染料（如噻嗪和噻嗪）、三嗪、天然色素：如卟啉、藻胆蛋白（包括藻红蛋白和藻青蛋白）、叶绿素和它们的模拟物或衍生物、类胡萝卜素、acridine、氧杂葱（包括荧光素和罗丹明）、靛蓝染料、噻吨、香豆素、聚甲炔（包括二和三芳基次甲基和它们的肽菁和金属酞花青衍生物）。

类似地，可用范围广泛的放射化合物作为本发明所用试剂的产生信号标记部分，其中有标记碘-125-化合物。

另外，可将结合配体与天然或合成化合物（能产生可用已知方法测定到的化学发光信号）偶联。适合的化学发光化合物包括荧光素、草酸酯、1,2-二噻乙烷、鲁米诺或其衍生物，但不限于此。如果适合，可用过氧化氢、酶，如荧光素酶，或其它化学剂从所用的产生信号分子中产生化学发光信号。

强阴离子信号产生分子最好不要用于本发明的方法中，因为它们趋向于与样品中可能存在的血清蛋白质（如人血清白蛋白(HSA)）结合。可以用的特别适合的例子是异硫氰酸荧光素、罗丹明 B 或 N-（试卤灵-4-羰基）哌啶-4-羧酸-N-羟基琥珀酰亚胺-酯或 resos。

按本发明方法的一实例，可从体液样品中分离出含至少一部分 TC II，通过将该体液与 TC II 特异性结合配体反应，然后从余下的样品中分离出 TC II 结合组

分,从而分离和浓缩其中的靶分析物。在本发明的一实例中,可用针对 holo-TC II 的可检测结合配体来测定分离的结合组分中存在的 TC II-钴胺素复合物。在与 TC II 结合配体接触之前、同时或之后,和在从剩余样品中分离出 TC II 结合组分之前或之后,将 holo-TC II 结合配体与待研究的样品接触。

相应地,可从剩余的样品中分离出含钴胺素的组分(如包括 holo-TC II 和 holo-HC),通过待研究的体液与固定的或受限的(tethered)钴胺素或其模拟物或片段(其结合于脱辅基-TC II 和脱辅基-HC)反应,并与含 holo-TC II 和 holo-HC 的剩余样品的结合组分中分离。然后可用可检测的 TC II 结合配体来检测分离组分中存在的 TC II-钴胺素复合物。在与结合钴胺素接触之前、同时或之后和在与剩余样品中结合组分分离之前或之后,可将可探测的结合 TC II 的配体与待研究的样品接触。

在一些实例中,可将脱辅基和/或 holo-TC II/HC 复合物的一种或其它成分的固定化配体加样到柱上。然后将含有 TC II 钴胺素复合物的体液加样到柱中,与结合的配体接触。

冲洗或洗涤柱,并可用洗脱液(如果需要)从柱上释放出结合组分便利其收集。如果未结合组分的含量是或也是要分析的(关于其它成分),可用缓冲液或介质(用校准微量移液管加入)洗涤此柱,以确保加入和收集已知的精确体积。所加入的体积宜在 3%所需(即校准)体积以内,更佳的在 1 或 2%以内。同样地,如果在检测前要从柱上释放出待分析组分,应用校准微量移液管加入用于释放复合物的洗脱液。

在另一实例中,可将用于分离样品某组分的结合配体固定在特定的固相支持物(如胶乳或聚合物小珠)上。为了有助于操作和分离,可用磁性小珠,事实上这是本发明的一个优选实例。本文所用的术语“磁性”指当将其置于磁场时能具有磁矩的支持物。换言之,含磁性颗粒的支持物可通过磁性聚集方便地移动,从而提供了一种快速、简单和有效的方法在配体结合后来分离这些组分。

因此用本发明的方法,通过施加一磁场(例如用永久磁铁)可将吸附有 TC II-钴胺素复合物的磁性颗粒移到一适当表面上。通常在装有样品混合物的容器一边加一磁铁,使颗粒聚集在容器壁上,从而分离它们以作进一步分析。

特别优选的超顺磁性颗粒是 Sintef 在欧洲专利申请 106873 中列举的实例,如可避免反应中颗粒的磁性凝集和聚集。熟知的由 Bang Particles(US)制造的磁性小珠特别适用于本发明。

通常,除评估的样品外,含有已知 holo-TC II 复合物成分的校准样品也在

进行本发明的分析方法中得到评估，其的测定值可用于绘制校准曲线，从该曲线可确定研究样品的结合 TC II 的钴胺素含量。用于 holo-TC II 复合物测定的校准样品的性质、转化或调节因素的选择可多种多样，取决于例如用于分析的结合和分离步骤中的具体配体，和影响样品结合和分离的方法的其它方面，如缓冲液组成、分析条件等。通常，所用的校准样品的 holo-TC II 含量为 0—300pmo/l。结合 TC II 的钴胺素通常可测得的参考范围为 30—160pmol/l。

holo-TC II 校准用标准通常是人、天然或重组 holo-TC II。将 holo-TC II 作为校准物用于 holo-TC II 的分析是新颖的，构成本发明的另一方面。

从另一角度来看，本发明提供一种用于诊断分析的试剂盒，所述的试剂盒包括：

固定的或可固定的 TC II 或 holo-TC II 的特异性结合配体；

较佳地，已知浓度的 holo-TC II 溶液和更佳地是具有某一范围 holo-TC II 复合物浓度的一套溶液；

任选地，使 holo-TC II 释放钴胺素的分离试剂；和

任选地，带标记的配体。

本发明的分析方法测定钴胺素的代谢活性库，通过测定 holo-TC II 复合物或分离 holo-TC II 复合物，然后测定与其相关的钴胺素，从而提供一种在发生钴胺素不足临床表现之前或之后，测定钴胺素不足的方便方法。这种分析方法可方便地在症状发生之前使用，因为它能精确地预测钴胺素的负平衡值。

现用以下非限制性的实施例和附图说明本发明：

附图说明

图 1 是 holo-TC II 的标准曲线；其中“cpm”表示“每分钟计数”。

图 2 是一显示血清总钴胺素和 holo-TC II 浓度关系的图，其中“totVitB12”和图 3 中的“totVB12”表示“总维生素 B₁₂”；和

图 3 是一显示血清总钴胺素和 holo-HC 浓度关系的图。

具体实施方式

实施例 1

将 TC II 特异性抗体（如单克隆或多克隆抗体）固定在可磁化颗粒上。将一份血清（100—500μl）与等体积的 PBS 混合，让它们与过量的固定化抗体和过量的标记有 I¹²⁵ 的非重叠性抗 holo-TC II 抗体（如单克隆抗体）反应 15 分钟。用强磁铁沉淀磁性颗粒，除去上清液，并用 PBS 洗涤颗粒。

测定放射性，用内插法在标准曲线上确定样品中 holo-TC II 的浓度。

实施例 2

将 TC II 特异性抗体（如单克隆或多克隆抗体）固定在可磁化颗粒上。将一份血清（600 μ l）与等体积的 PBS 混合，让它们与抗体反应 30 分钟。用强磁铁沉淀磁性颗粒，除去上清液。用 PBS 洗涤颗粒一次，然后依次用含氰化钾（100 μ M）的氢氧化钠（0.3M）、二硫苏糖醇（15mM）和固定量的总体积为 100 μ l 的维生素 B₁₂（标记有 I¹²⁵ 或 Co⁵⁷）处理 15 分钟，释放出结合于固定化 holo-TC II 的钴胺素，同时将所有形式的钴胺素转化成维生素 B₁₂，并与固定量的带标记维生素 B₁₂ 混合。加入在 100 μ l 硼酸盐缓冲液中的限量内因子（Intrinsic Factor），让它们反应 10 分钟。用强磁铁沉淀磁化颗粒，除去 150 μ L 上清液，测定放射性。从标准曲线上确定血清样品中结合 TC II 的钴胺素浓度。

另外，可用 Abbot's IMx 方法或类似方法测定释放的钴胺素。

实施例 3

将 TC II 特异性抗体（如单克隆或多克隆抗体）固定在可磁化颗粒上。在一份血清（100—500 μ l）与等体积 PBS 的混合物中加入固定量的 I¹²⁵ 标记的 holo-TC II 和限定量的固定化抗 holo-TC II 抗体。培育 15 分钟后，用强磁铁沉淀磁性颗粒。用 PBS 洗涤，测定放射性。从标准曲线上确定 holo-TC II 的浓度。

实施例 4

将重组体 holo-TC II 固定在可磁化颗粒上。在一份血清（100—500 μ l）与等体积 PBS 的混合物中加入固定量的固定化 holo-TC II 和过量的 holo-TC II 特异性抗体（如单克隆或多克隆抗体），其上标记有 I¹²⁵。培育 15 分钟后，用强磁铁沉淀磁性颗粒。用 PBS 洗涤，测定放射性。从标准曲线上确定 holo-TC II 的浓度。

实施例 5

在一份血清（100—500 μ L）中加入过量生物素酰化的钴胺素，以结合所有脱辅基 TC II 和脱辅基 HC。培育 10 分钟后，用包被有亲和素的磁性颗粒处理血清样品 10 分钟。用强磁铁沉淀这些颗粒。回收上清液，与两种非重叠性单克隆抗 TC II 抗体（一种标记有 I¹²⁵，另一种与生物素偶联）混合。10 分钟后，加入包被有亲和素的磁性颗粒，使其结合生物素酰化的加合物 10 分钟。随后，用强磁铁沉淀颗粒，用 PBS 洗涤。测定放射性，用内插法在标准曲线上确定 holo-TC II 的浓度。

实施例 6

与实施例 5 相同, 但将脱辅基 TC II 缺失的血清与固定量的 I^{125} 标记的 holo-TC II 和限定量的 TC II 抗体(固定在可磁化颗粒上)混合。培育 15 分钟后, 用强磁铁沉淀颗粒。

用 PBS 洗涤颗粒, 测定放射性。

实施例 7

将钴胺素固定在可磁化微粒体上, 如用共价偶联或用生物素-(链霉)亲和素。通常, 室温暗处用 $1\mu\text{M}$ 生物素酰化的钴胺素培育包被有链霉亲和素的可磁化微球 30 分钟。用磁铁沉淀小珠, 用 PBS 洗涤 2 次, 以 1% 在 PBS+5mg/ml HAS 中重悬。在一份血清(100-500 μL)中加入等体积的 PBS 和 1/10 体积的包被有钴胺素的磁化微球。室温、暗处将混合物培育 30 分钟, 从而结合所有脱辅基 TC II 和脱辅基 HC。用磁铁沉淀颗粒, 回收上清液, 与两种非重叠性单克隆抗 TC II 抗体(一种标记有 I^{125} , 另一种与生物素偶联)混合。10 分钟后, 加入包被有(链霉)亲和素的磁性颗粒, 使其结合生物素酰化的加合物 10 分钟。随后, 用磁铁沉淀颗粒, 用 PBS 洗涤。测定放射性, 用内插法在标准曲线上确定 holo-TC II 的浓度。

实施例 8

与实施例 7 相同, 但将过量的生物素酰化的钴胺素直接加入到血清样品+PBS 中, 以结合所有脱辅基 TC II 和脱辅基 HC。培育 10 分钟后, 室温、暗处用包被有(链霉)亲和素的磁化微球处理血清样品 30 分钟。

实施例 9

将对人 TC II 特异性的兔抗体(表观结合常数 $>5\times 10^9\text{ M}^{-1}$)固定在 $1\mu\text{m}$ 包被有羊抗兔 IgG 抗体(Indica Diagnostics)的可磁化微球上。将 49 位健康自愿者的各 400 μL 血清样品与等体积的 PBS 和 40 μL 固定化抗体(1%)混合。将混合物置于室温、暗处 1 小时, 然后用磁铁沉淀微球。用冰冷的缓冲液(PBS+0.02% Tween 20)洗涤沉淀物一次, 随后将其重悬在 50 μL 磷酸缓冲液中(其中含有 50mM 二硫苏糖醇、0.001% 碘化钾和固定量的 $^{57}\text{Co-CN-}$ 钴胺素(Amersham), pH7.5)。使其在室温维持 30 分钟, 其后加入 25 μL 0.5M 氢氧化钠, 15 分钟后加入以硼酸缓冲液(pH 8.6)配的 300 μL 固定在葡聚糖上的内因子(足以结合 50% 指示剂)。室温、暗处 1 小时后, 1000g 离心诸样品, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分钟, 小心移去上清液, 在 Packard Riastar 上计数沉淀。在用 8 种与样品相同处理的校准剂(0-500pM 的 holo TC II)建立的标准曲线上确定结合 TC II 的钴胺素的浓度。还用 Abbot IMx B12 分析方法来分析 37 份血清样品的血清总钴胺素。

图 1 显示了 holo-TC II 的标准曲线，图 2 显示了 37 位健康自愿者中血清总钴胺素与 holo-TC II 浓度之间的关系。表明相关性低， $r^2=0.50$ 。相反，holo-HC 与血清总钴胺素的相关性高， $r^2=0.96$ （图 3）。49 位健康自愿者的平均 holoTC 浓度为 $64 \pm 28 \text{pM}$ ，95%参考范围为 23–127pM。

本分析的 CV 为 10%，分析灵敏度（0—校准剂—3s.d.）低于 10pM，而且不会与结合咕啉交叉反应。

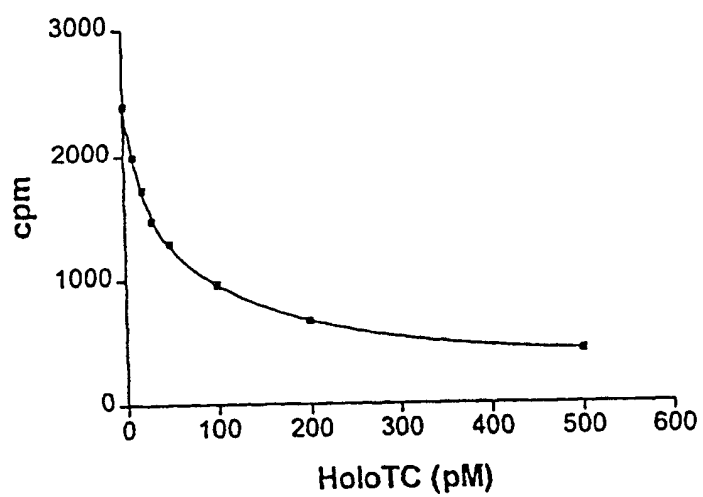


图 1

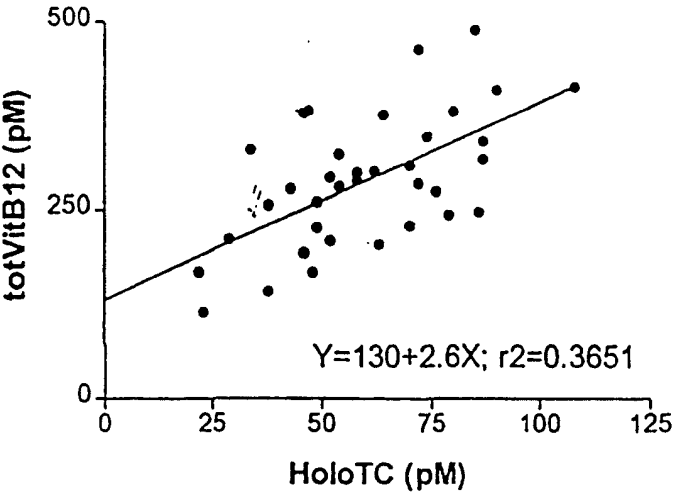


图 2

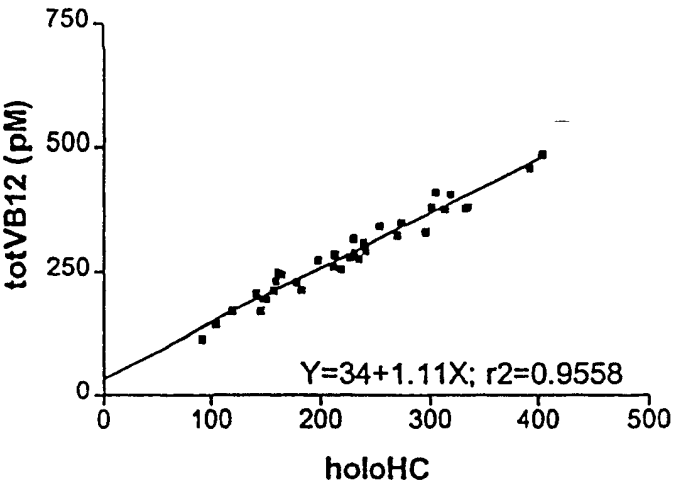


图 3