



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101828112 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 13

(21) 申请号 200880112061. X

G01N 33/72 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

2007-268952 2007. 10. 16 JP

JP 特开平 5-99923 A, 1993. 04. 23, 说明书第 0002-0011 段.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2010. 04. 16

JP 特开平 5-99923 A, 1993. 04. 23, 说明书第 0002-0011 段.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/JP2008/068182 2008. 10. 06

EP 0708078 A1, 1996. 04. 24, 说明书第 2 页, 权利要求 1-7.

(87) PCT 申请的公布数据

W02009/051032 JA 2009. 04. 23

EP 0708078 A1, 1996. 04. 24, 说明书第 2 页, 权利要求 1-7.

(73) 专利权人 荣研化学株式会社

地址 日本东京都

CN 1834611 A, 2006. 09. 20, 全文.

CN 1975380 A, 2007. 06. 06, 全文.

CN 1197211 A, 1998. 10. 28, 全文.

EP 0444263 A1, 1991. 09. 04, 全文.

(72) 发明人 诹合伸

JP 特开平 7-229902 A, 1995. 08. 29, 全文.

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

审查员 王晓媛

代理人 段承恩 田欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 1/28 (2006. 01)

G01N 33/48 (2006. 01)

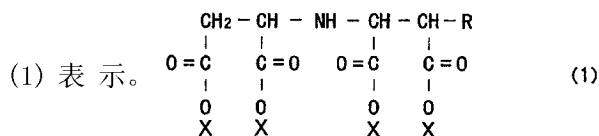
权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

血红素蛋白的稳定化方法

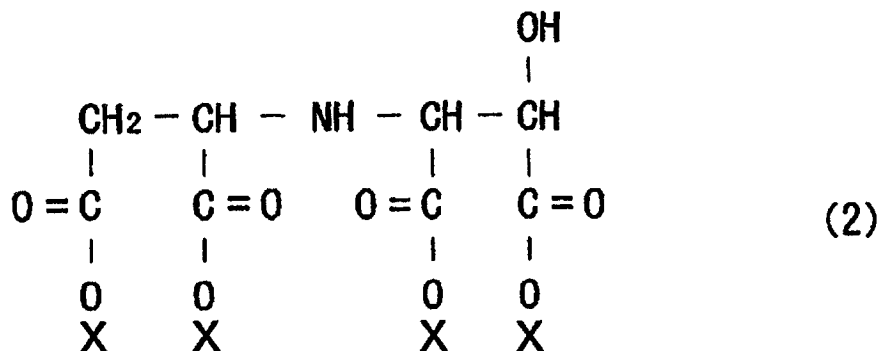
(57) 摘要

本发明的课题是提供对以血红蛋白为代表的血红素蛋白的变性・分解作用有效的血红素蛋白的稳定化方法和保存溶液。作为本发明的解决问题的方法是, 提供血红素蛋白的稳定化方法和保存溶液, 其特征在于, 使亚氨基酸或其盐共存于含有血红素蛋白的样品中, 所述亚氨基酸以式



(式中, R 表示氢原子或羟基, 且 X 表示氢原子、碱金属或铵根。)

1. 一种血红素蛋白的稳定化方法,其特征在于,使下述式(2)所表示的3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸或其盐共存于含有血红蛋白的水溶液或粪便中,

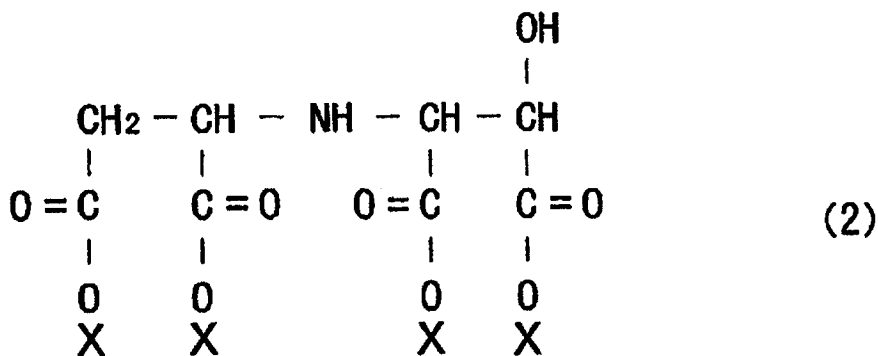


上式中,X表示氢原子、碱金属或铵根。

2. 根据权利要求1所述的血红素蛋白的稳定化方法,所述3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸或其盐的浓度范围为0.001~0.200摩尔/L。

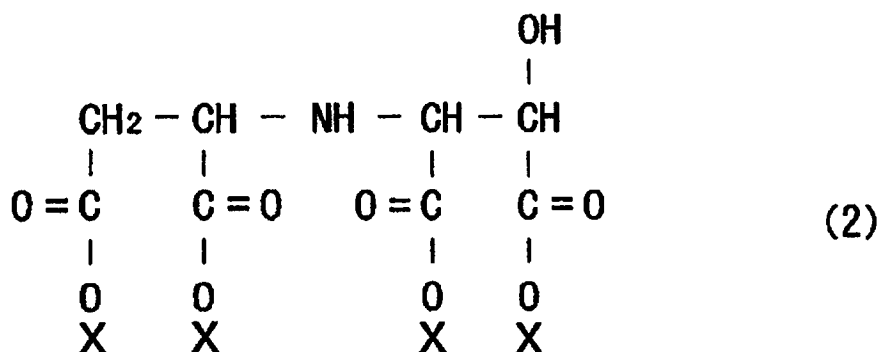
3. 根据权利要求1所述的血红素蛋白的稳定化方法,所述血红素蛋白为血红蛋白、肌红蛋白、过氧化物酶或过氧化氢酶。

4. 一种血红素蛋白的保存溶液,其特征在于,含有权利要求1所述的式(2)所表示的3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸或其盐



上式中,X表示氢原子、碱金属或铵根。

5. 式(2)所表示的3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸或其盐的用途,用于在权利要求1~3的任一项所述的血红素蛋白的稳定化方法中使用,



上式中,X表示氢原子、碱金属或铵根。

血红素蛋白的稳定化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及血红素蛋白的稳定化方法,特别是涉及在粪便、尿或血液样品中检查血红素蛋白时的血红素蛋白的稳定化方法。

背景技术

[0002] 近年来,作为大肠癌等消化系统疾病的筛查方法,广泛应用检测消化器官出血引起的粪便中的人血红蛋白(便潜血)的方法。这种人血红蛋白的检测方法是利用人血红蛋白的特异性抗体的免疫学方法,取代了以往的基于化学显色反应的试纸法,作为不需要限制饮食的简便检查方法而固定下来。

[0003] 作为人血红蛋白的免疫学检测法,可列举例如:在琼脂平板内利用由抗人血红蛋白抗体与被检样品中的人血红蛋白形成的沉淀线的单向免疫扩散法、采用以抗人血红蛋白抗体进行了敏化的胶乳粒子的胶乳凝集法、采用以酶或放射性元素标记的抗人血红蛋白抗体的酶免疫法或放射性免疫法、采用以抗人血红蛋白抗体进行了敏化的胶体金粒子的胶体金凝集比色法等。

[0004] 然而,人血红蛋白具有在被检液中逐渐变性、抗原性降低这样的性质。此外,被检液中的人血红蛋白往往由于保存温度等保存条件而加速变性、或被粪便中的细菌和/或消化酶分解。这样的变性·分解的结果是人血红蛋白的立体结构被破坏而导致抗原性降低。因此,在人血红蛋白的免疫学测定方法中,血红蛋白变性·分解会导致错误的诊断结果。

[0005] 另一方面,在便潜血检查中,通常是将被验者自身在自己家等采集的粪便溶解在包含粪便溶解液的密闭容器中以供检查。在该情况下,粪便中的人血红蛋白往往在溶液中放置数天,或由于利用邮政等运输方式而置于高温下。此外,即使在检查机构采集粪便的情况下,也有时由于检查其它项目,而在便潜血的检查之前需要大量时间。在这样的状况下,如前所述,由于人血红蛋白发生变性·分解,因此妨碍高准确度的测定。

[0006] 为了防止这种溶液中的人血红蛋白的变性·分解,提出了例如:添加乙基汞硫代水杨酸钠和/或氯己定等常用抗菌剂的方法(例如参照专利文献1),以及添加糖类的方法(例如参照专利文献2)、添加除人以外的动物血红蛋白(例如参照专利文献3)、添加除人以外的动物血清(例如参照专利文献4)、添加溶菌酶(例如参照专利文献5)、添加原卟啉铁(例如参照专利文献6)等。

[0007] 然而,在这些公报中记载的人血红蛋白稳定化技术不能充分抑制包含粪便的被检液中的人血红蛋白变性·分解。

[0008] 除此以外,还提出了采用乙二胺四乙酸(以下省略为EDTA)的血红蛋白稳定化方法(例如参照专利文献7)。

[0009] 然而,本发明者们进行补充试验的结果证实,不能期待通过单独使用EDTA而对粪便中的血红蛋白产生充分的稳定化作用。

[0010] 因此,本申请人提出了比单独使用EDTA稳定化效果更好的、添加水溶性过渡金属配合物的方法(例如参照专利文献8)。此外,本申请人已经提出了下述方法:使其与亚铁

氰化物共存的血红蛋白的稳定化方法（例如参照专利文献 9）、共存血红蛋白的酶分解产物的血红蛋白的稳定化方法（例如参照专利文献 10）、共存过渡金属类的血红素蛋白的稳定化方法（例如参照专利文献 11）、共存苹果酸等有机酸的血红素蛋白的稳定化方法（例如参照专利文献 12）和共存脱脂白蛋白的血红素蛋白的稳定化方法（例如参照专利文献 13）。

- [0011] 专利文献 1 :特开昭 63-271160 号公报
 [0012] 专利文献 2 :特开昭 63-243756 号公报
 [0013] 专利文献 3 :特开平 2-296149 号公报
 [0014] 专利文献 4 :特开平 4-145366 号公报
 [0015] 专利文献 5 :特公平 5-69466 号公报
 [0016] 专利文献 6 :特开平 5-281227 号公报
 [0017] 专利文献 7 :特开平 5-99923 号公报
 [0018] 专利文献 8 :特开平 7-229902 号公报
 [0019] 专利文献 9 :特开平 11-118806 号公报
 [0020] 专利文献 10 :特开平 11-218533 号公报
 [0021] 专利文献 11 :特开 2001-249132 号公报
 [0022] 专利文献 12 :特开 2003-014768 号公报
 [0023] 专利文献 13 :特开 2003-194825 号公报

发明内容

[0024] 本发明的第一课题是提供对以血红蛋白为代表的血红素蛋白的变性・分解作用有效的新的血红素蛋白的稳定化方法。目的是提供使特别是与变性・分解作用强的粪便成分共存的血红蛋白有效地稳定化的技术。

[0025] 本发明的第二课题是提供利用了新的血红素蛋白的稳定化剂的血红素蛋白的保存溶液。

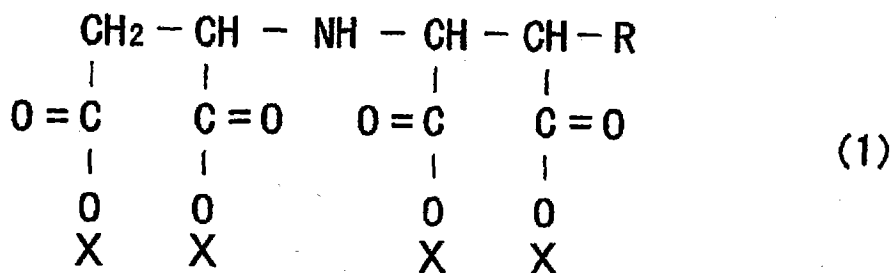
[0026] 本发明的第三课题是提供在新的血红素蛋白的稳定化方法中使用的特定化合物。

[0027] 本发明包括下述 (1) ~ (7) 的构成。

[0028] (1) 一种血红素蛋白的稳定化方法,其特征在于,使亚氨基酸或其盐共存于含有血红素蛋白的样品中。

[0029] (2) 根据上述 (1) 所述的血红素蛋白的稳定化方法,所述亚氨基酸或其盐为下述式 (1) 所表示的化合物和它们的混合物。

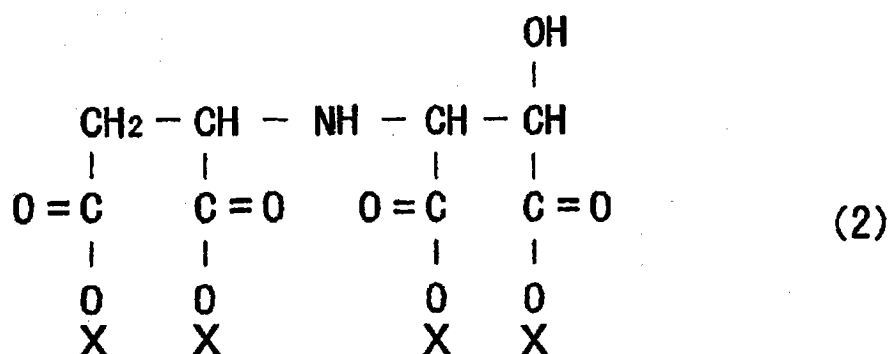
[0030]



[0031] (式中, R 表示氢原子或羟基, 并且 X 表示氢原子、碱金属或铵根。)

[0032] (3) 根据上述 (1) 或 (2) 所述的血红素蛋白的稳定化方法, 所述亚氨基酸盐为下述式 (2) 所表示的 3- 羟基 -2,2'- 亚氨基二琥珀酸或其盐。

[0033]



[0034] (式中, X 表示氢原子、碱金属或铵根。)

[0035] (4) 根据上述 (1) ~ (3) 的任一项所述的血红素蛋白的稳定化方法, 所述亚氨基酸或其盐的浓度为 0.001 ~ 0.200 摩尔 /L 的范围。

[0036] (5) 根据上述 (1) 所述的血红素蛋白的稳定化方法, 所述血红素蛋白为血红蛋白、肌红蛋白、过氧化物酶或过氧化氢酶。

[0037] (6) 根据上述 (1) 所述的血红素蛋白的稳定化方法, 含有所述血红素蛋白的样品为粪便、尿或血液。

[0038] (7) 一种血红素蛋白的保存溶液, 其特征在于, 含有上述 (1) ~ (3) 的任一项所述的亚氨基酸或其盐。

[0039] (8) 在上述 (1) ~ (6) 的任一项所述的血红素蛋白的稳定化方法中使用的亚氨基酸或其盐。

[0040] 在本发明的血红素蛋白的稳定化方法中, 即使与对血红素蛋白具有强 变性 · 分解作用的生物体成分、特别是粪便成分共存, 也可以获得保护作用。因此, 对于生物体成分的分析、例如粪便潜血的检测中的样品中所含的血红蛋白的稳定化是有用的。特别是对于作为需要保护抗原结构的免疫学分析对象的血红素蛋白, 有助于维持其抗原性。本发明的方法通过在保存溶液和血红素蛋白的稳定化方法中使用的化合物使粪便样品中的血红蛋白有效地稳定化, 可以期待防止由血红蛋白变性 · 分解引起的假阴性结果。

具体实施方式

[0041] 下面, 更详细地说明本发明。

[0042] 在本发明中, 使亚氨基酸或其盐共存于含有血红素蛋白的样品中。该亚氨基酸可以从公知物质中适当选择, 但特别优选上述式 (1) 所表示的化合物、更优选上述式 (2) 所表示的 3- 羟基 -2,2'- 亚氨基二琥珀酸或其盐。此外, 作为上述式 (1) 和式 (2) 中的 X 所表示的碱金属, 可列举例如锂、钠、钾、铷、铯。

[0043] 此外, 本发明中使用的亚氨基酸可以使用通过以下方法合成的物质: 例如, 以天冬氨酸和环氧琥珀酸为原料的方法 (例如特开平 9-183773 号公报)、以马来酸和氨为原料的方法 (例如美国专利第 639863 号说明书)、以天冬氨酸和马来酸为原料的方法 (例如特开平

5-320109 号公报)、以马来酸半酯和马来酸、氨为原料的方法(例如特开平 8-12631 号公报)。

[0044] 含有血红素蛋白的样品中的亚氨基酸或其盐的浓度为 0.001 ~ 0.200 摩尔/L,更优选为 0.050 ~ 0.150 摩尔/L。如果该亚氨基酸或其盐的浓度低于 0.001 摩尔/L,则血红素蛋白的稳定化效果不充分。另一方面,如果亚氨基酸或其盐的浓度超过 0.200 摩尔/L,则溶解度降低,免疫反应也被抑制。

[0045] 在本发明中,虽然不是必须的,但通过根据需要加入公知的蛋白质保护剂可以使血红素蛋白的稳定化效果进一步提高。作为这样的蛋白质保护剂,可列举以白蛋白和/或明胶为代表的惰性蛋白等。

[0046] 白蛋白可以使用任意白蛋白,但特别优选来源于动物的血清和/或卵子的白蛋白。作为其具体例,可列举来源于牛、马、山羊、绵羊、猪、兔以及这些动物的幼崽或胎儿的血液的白蛋白。

[0047] 对于该白蛋白,除了上述白蛋白以外,还已知其酶解物,本发明中的白蛋白也可以包含这种由白蛋白衍生的蛋白质。

[0048] 除了上述蛋白质保护剂以外,添加例如抗菌剂和/或缓冲剂等迄今为止已知的多种血红素蛋白保护成分也是有效的,所述抗菌剂用于防止微生物的不必要繁殖,所述缓冲剂可提供有利于保存血红素蛋白的 pH 值。

[0049] 作为抗菌剂,可列举溶菌酶、苯甲酸乙酯、青霉素、ファンギソン(两性霉素 B)、链霉素或头霉素,以及非青霉素类的一系列抗生素等。此外,已知胰蛋白酶抑制剂和/或 $\alpha 2$ 巨球蛋白等蛋白酶抑制剂也可以使血红素蛋白稳定化。

[0050] 分散介质的 pH 值设定为可以稳定地维持血红素蛋白的范围。在极端的酸或碱条件下可能会破坏血红素蛋白的稳定性,因而优选中性范围的 pH 值。该 pH 值具体为 5 ~ 10,优选为 6 ~ 8 左右。

[0051] 为了维持 pH 值,可以利用适当的缓冲剂。例如,羟基乙基哌嗪-2-乙磺酸(以下省略为 HEPES)和/或哌嗪-双(2-乙磺酸)(以下省略为 PIPES)等古德缓冲剂(Good's buffer)可以在提供被认为血红素蛋白的结构最稳定的 6 ~ 8 的 pH 值的同时,用作通过免疫反应检测血红素蛋白时的反应用缓冲液,因而作为特别优选的缓冲剂列举出。除此以外,也可以利用磷酸缓冲液、Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸缓冲液等。

[0052] 本发明的血红素蛋白的稳定化方法可以在粪便、尿、血液样品中的血红素蛋白的检测中使用。作为血红素蛋白,可以从以血红素为构成成分的蛋白质中适当选择,可列举例如血红蛋白、肌红蛋白、过氧化物酶或过氧化氢酶。特别是对于作为需要保护抗原结构的免疫学分析对象的血红素蛋白,本方法对于维持其抗原性是有用的。

[0053] 在本发明中,可以提供含有作为血红素蛋白的稳定因子发挥作用的亚氨基酸或其盐类的血红蛋白的保存溶液。

[0054] 此外,本发明的保存溶液根据需要可以含有蛋白质保护剂和缓冲剂。作为蛋白质保护剂和缓冲剂,可以从上述物质中适当选择而使用。

[0055] 本发明可以提供应用了上述血红素蛋白的稳定化技术的血红素蛋白的免疫学测定方法。作为免疫学测定方法,可以列举例如胶乳凝集反应法、胶体金凝集反应法、免疫层析法或 ELISA 法等。在任一测定方法中,都是通过使亚氨基酸或其盐类共存于含有血红素蛋白的样品中,来保护保存中的抗原活性、抑制测定值降低。

[0056] 本发明的血红素蛋白的稳定化方法对于使存在于生物体样品中的作为分析对象的血红素蛋白稳定化是有用的。特别是在采用识别血红素蛋白的抗体的免疫学方法测定血红素蛋白的方法中,可使作为测定对象的血红素蛋白的抗原性高度稳定化。应检测血红素蛋白的生物体样品已知有粪便、尿、血液。特别是粪便中的血红蛋白是消化器中出血的指标,尿中的血红蛋白是尿道中出血的指标。

[0057] 在将本发明的稳定化方法应用于存在于粪便样品中的血红蛋白的情况下,可以向用于悬浮粪便的保存溶液中添加亚氨基酸或其盐类。通常在检测粪便中的血红蛋白时,使粪便悬浮在适当保存溶液中,根据需要过滤制成免疫学分析用样品。

[0058] 下面通过实施例更详细地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0059] 实施例

[0060] 实施例各浓度的 HIDS 产生的血红蛋白的稳定化效果

[0061] 向包含 0.05 摩尔/L HEPES、0.9%氯化钠并且其余部分为纯水的 pH7.0 的溶液中,以下表 1 中所示的浓度分别添加 0 ~ 0.2 摩尔/L 的 3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸四钠(HIDS),从而配制保存溶液。HIDS 使用(株)日本触媒制的产品。

[0062] 向该保存溶液中添加溶血血红蛋白或溶血血红蛋白与便检体的混合物,测定各试验液的血红蛋白浓度(即刻浓度)。然后,在 37℃ 下保存 20 小时,然后用保存后的血红蛋白浓度除以上述即刻浓度,计算出血红蛋白的残存率。

[0063] 血红蛋白的浓度使用免疫学血红蛋白测定试剂 OC オート III(荣研化学(株)制),用 OC センサー NEO 分析仪(荣研化学(株)制)进行测定。

[0064] 如表 1 所示,对于将 HIDS 仅添加至血红蛋白中而得的试验液,从添加浓度 0.001 摩尔/L 开始可观察到稳定化效果。此外,对于存在血红蛋白和便检体的试验液,从添加浓度 0.005 摩尔/L 开始可观察到稳定化效果。可知特别是 HIDS 的添加浓度为 0.050 摩尔/L 以上时,血红蛋白的稳定化效果显著。

[0065] 表 1. HIDS 产生的血红蛋白稳定化效果

[0066]

抗原	血红蛋白	血红蛋白+便检体
HIDS 添加浓度 [摩尔/L]	残存率 [%]	残存率 [%]
- 0.001 0.005 0.010 0.050 0.075 0.100 0.150 0.200	77.7 82.8 83.9 84.2 84.1 85.2 87.8 88.2 86.2	27.5 28.8 32.3 39.2 50.8 53.9 55.9 57.8 46.3

[0067] 比较例

[0068] 除了添加乙二胺-N, N, N', N' - 四乙酸 (EDTA)、亚氨基二乙酸 (IDA) 或 N-(2-羟基乙基) 亚氨基二乙酸 (HIDA) 代替实施例的 3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸四钠 (HIDS) 以外,通过与实施例同样的方法,研究血红蛋白的稳定化效果。

[0069] 如表 2 所示,在使用 EDTA、IDA 或 HIDA 作为螯合剂的情况下,在仅含血红蛋白的试验液中观察到微弱的稳定化效果。然而,在粪便的共存下,在使用 IDA 和 HIDA 作为螯合剂的情况下,未观察到可被认为是稳定化的水平的效果。在使用 EDTA 的情况下,即使在便检体的共存下,也可观察到一定程度的高水平的血红蛋白稳定化效果,但是当添加浓度为 0.010 摩尔/L 以上时,血红蛋白的稳定化效果也比实施例的保存溶液的稳定化效果明显低得多。

[0070] 表 2. 各种螯合剂产生的血红蛋白稳定化效果

[0071]

抗原	血红蛋白	血红蛋白 + 便检体
	残存率 [%]	残存率 [%]
未添加螯合剂	77.7	27.5
EDTA 添加浓度 [摩尔 /L]		
0.001	79.5	34.3
0.010	79.8	35.8
0.050	82.4	37.1
IDA 添加浓度 [摩尔 /L]		
0.001	82.1	28.0
0.010	80.9	27.3
0.050	81.0	26.3
HIDA 添加浓度 [摩尔 /L]		
0.001	80.3	26.1
0.010	79.3	26.4
0.050	81.6	27.3

[0072] 产业可利用性

[0073] 根据本发明,通过使亚氨基酸或其盐共存于含有血红素蛋白的样品中,可以稳定地维持血红素蛋白,并可以防止便潜血检查中由血红蛋白的变性・分解引起的假阴性。结果表明,可以进行更高准确度的便潜血检查。