



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101512012 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 04

(21) 申请号 200780033470. 6

(22) 申请日 2007. 10. 16

(30) 优先权数据

283418/2006 2006. 10. 18 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 03. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2007/070172 2007. 10. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02008/050636 JA 2008. 05. 02

(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 荒武知子 片山有基 三岛慎刚

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 樊卫民 郭国清

(51) Int. Cl.

C12Q 1/60 (2006. 01)

C12Q 1/26 (2006. 01)

C12Q 1/32 (2006. 01)

C12Q 1/44 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

G01N 33/92 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2000/017388 A1, 2000. 03. 30, 全文.

审查员 田园

权利要求书2页 说明书32页

(54) 发明名称

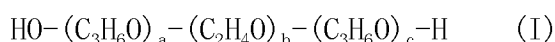
小而密低密度脂蛋白中的胆固醇的定量用试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种 sdLDL-C 的定量方法, 其中包括: 步骤 (i), 在含有优先抑制由胆固醇酯水解酶等胆固醇测定用酶引起的 sdLDL-C 的反应的表面活性剂的反应液中, 使该胆固醇测定用酶作用于样品, 除去该样品中的 HDL-C、VLDL-C、CM-C 以及 LgLDL-C; 步骤 (ii), 添加引发在所述步骤 (i) 后的反应液中残留的 sdLDL-C 的反应的试剂, 生成过氧化氢或者还原型辅酶, 并测定所生成的过氧化氢或者还原型辅酶; 以及步骤 (iii), 由 (i) 和 (ii) 中的测定值、与预先制作的标准曲线来确定该样品中的 sdLDL-C 浓度。

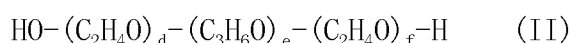
1. 一种样品中的 sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:

(a) 第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶以及过氧化氢除去试剂,所述过氧化氢除去试剂含有氧化偶合显色反应中使用的 2 种氧化偶合色素原的 1 种和过氧化活性物质,所述表面活性剂 A 是选自聚氧乙烯烷基胺、选自烷基氧化胺和聚氧乙烯烷基氧化胺的氧化胺类、烷基甜菜碱、烷基铵-1-丙磺酸盐、酰胺烷基甜菜碱、聚氧乙烯苄基-烷基季铵盐、聚氧乙烯脂肪酰胺、聚氧乙烯多环苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯脂肪酰胺硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基胺硫酸酯盐、N-酰基牛磺酸盐、N-酰基肌氨酸盐、乙二胺-聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、分子量为 1200 以下的聚丙二醇、由下述通式 (I) 表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及烷基的碳原子数为 9 以下的聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的表面活性剂,



通式 (I) 中, a、b 及 c 相同或者不同,表示 1 ~ 200 的整数;和

(b) 第二试剂,含有表面活性剂 B、以及氧化偶合显色反应中使用的 2 种氧化偶合色素原的另 1 种,所述表面活性剂 B 是选自 HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数为 20 以下的聚氧乙烯烷基醚、HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数在 10 以上 20 以下的聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚、HLB 低于 16.0 的聚氧乙烯烷基苯基醚、HLB 低于 16.0 的聚氧乙烯聚氧化烯烷基苯基醚、HLB 低于 13.0 的聚氧乙烯多环苯基醚、HLB 低于 13.0 的聚氧乙烯聚氧化烯多环苯基醚、由下述通式 (II) 表示的聚氧丙烯的分子量为 1200 以上且聚氧乙烯的含量为 60% 以下的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及聚氧乙烯聚氧化烯烷基胺中的表面活性剂,

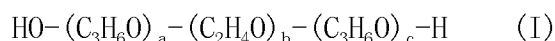


通式 (II) 中, d、e 及 f 相同或者不同,表示 1 ~ 200 的整数,

其中,所述 sdLDL-C 表示小而密低密度脂蛋白中的胆固醇。

2. 一种样品中的 sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:

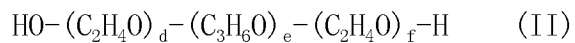
(a) 第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶以及胆固醇脱氢酶,所述表面活性剂 A 是选自聚氧乙烯烷基胺、选自烷基氧化胺和聚氧乙烯烷基氧化胺的氧化胺类、烷基甜菜碱、烷基铵-1-丙磺酸盐、酰胺烷基甜菜碱、聚氧乙烯苄基-烷基季铵盐、聚氧乙烯脂肪酰胺、聚氧乙烯多环苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯脂肪酰胺硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基胺硫酸酯盐、N-酰基牛磺酸盐、N-酰基肌氨酸盐、乙二胺-聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、分子量为 1200 以下的聚丙二醇、由下述通式 (I) 表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及烷基的碳原子数为 9 以下的聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的表面活性剂,



通式 (I) 中, a、b 及 c 相同或者不同,表示 1 ~ 200 的整数;

(b) 第二试剂,含有表面活性剂 B,所述表面活性剂 B 是选自 HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数为 20 以下的聚氧乙烯烷基醚、HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数在 10 以上 20 以下的聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚、HLB 低于 16.0 的聚氧乙烯烷基苯基醚、HLB 低于 16.0 的聚氧乙烯聚氧化烯烷基苯基醚、HLB 低于 13.0 的聚氧乙烯多环苯基醚、HLB 低于 13.0 的聚氧乙烯聚氧化烯多环苯基醚、由下述通式 (II) 表示的聚氧丙烯的分子量为 1200 以上且聚氧乙烯的含量为 60% 以下的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及聚氧乙烯聚氧化烯烷基胺中的表面

活性剂,



通式 (II) 中, d、e 及 f 相同或者不同, 表示 1 ~ 200 的整数,

其中, 所述 sdLDL-C 表示小而密低密度脂蛋白中的胆固醇。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒, 其中, 至少在第一试剂中含有白蛋白。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒, 其中, 作为第三试剂, 包含含有已知浓度的 sdLDL-C 的标准品。

5. 如权利要求 3 所述的试剂盒, 其中, 作为第三试剂, 包含含有已知浓度的 sdLDL-C 的标准品。

小而密低密度脂蛋白中的胆固醇的定量用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及样品中的小而密低密度脂蛋白（以下简记为 sdLDL）中的胆固醇（以下简记为 sdLDL-C）的定量方法以及定量用试剂盒。

背景技术

[0002] 血液中存在的脂蛋白根据其比重大致分为高密度脂蛋白（以下简记为 HDL）、低密度脂蛋白（以下简记为 LDL）、极低密度脂蛋白（以下简记为 VLDL）以及乳糜微粒（以下简记为 CM）4 类。构成各脂蛋白的脂质组成也不同，并且，根据构成各脂蛋白的载脂蛋白的种类的不同，在生物体中的作用大不相同。另外，作为在从 VLDL 到 LDL 代谢的过程中所生成的脂蛋白，存在密度在 VLDL 和 LDL 中间的中间密度脂蛋白（以下简记为 IDL），其在广义上也被分类为 LDL。

[0003] 临床检查中，作为动脉硬化诊断的筛选指标，使用总胆固醇、总甘油三酯、HDL 胆固醇、LDL 胆固醇、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 B 等。其中，被认为与动脉硬化形成紧密相关的 LDL 胆固醇已经开始被频繁地测定。另一方面发现，很多人尽管 LDL 胆固醇不高，但也具有动脉硬化病变。也有报道称：在该病症中，小而高密度的 LDL（该 LDL 称为 sdLDL）增加，sdLDL-C 与冠动脉疾病的相关程度在 LDL-C 以上 [参照“アーテリオスクレロシストロンボシスアンドヴアスキュラーバイオロジー (Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology)”，2004 年，第 24 卷，p. 558-563]。

[0004] 作为测定 sdLDL 的方法，已知有电泳法、超速离心法、分级沉淀法等。电泳法是使用 2 ~ 16% 的非变性梯度凝胶进行电泳、染色来测定 LDL 颗粒尺寸的方法，但操作繁杂，通用性差。另外，在该方法中虽然能够测定 LDL 的颗粒尺寸，但不能进行 sdLDL 的定量。此外，有通过离子强度的差使 sdLDL 混悬或溶解、再通过吸光度的差来测定 sdLDL 的方法（参照专利文献 1）。但是，该方法中由于对浊度进行测定，因此特异性和精度不充分，并且，该方法中虽然能够测定 sdLDL 量，但不能测定 sdLDL-C。

[0005] 对 sdLDL-C 进行定量的方法有超速离心法、分级沉淀法等。超速离心法是使用超速离心分离机分离提取出样品中相当于 sdLDL 的比重区域并测定该比重区域中的胆固醇的方法，能够作为 sdLDL-C 定量的标准方法。但是，该方法需要昂贵的设备，测定需要非常长的时间，且需要技术上熟练。

[0006] 分级沉淀法为如下方法：在第一步骤中，使用聚阴离子与 2 价阳离子或 1 价阳离子的组合、或者聚乙二醇，使样品中的 HDL 和 sdLDL 以外的脂蛋白聚集，通过离心分离或过滤器过滤除去聚集物，分离出 HDL 和 sdLDL；在第二步骤中，对分离得到的含有 HDL 和 sdLDL 的试样中的 sdLDL-C 进行定量（参照专利文献 2）。该方法比超速离心法操作简便，但由于需要进行分级沉淀操作，因此测定上需要时间。

[0007] 许多文献报道有如下方法：在表面活性剂存在下，使胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶特异性地作用于选自 HDL、LDL、VLDL 及 CM 中的一种或多种特定脂蛋白，来测定要测定的脂蛋白中的胆固醇。近来，报道了一种 sdLDL-C 的定量法，其特征在于，

在聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物或其衍生物的存在下,向样品中添加胆固醇测定用酶,使聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物或其衍生物选择性地作用于 sdLDL,并测定所生成的胆固醇的量(专利文献 3)。

[0008] 专利文献 1:日本特开 2003-28882 号公报

[0009] 专利文献 2:国际公开第 2004/053500 号小册子

[0010] 专利文献 3:国际公开第 2007/026829 号小册子

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供能够简便且准确地对样品中的 sdLDL-C 进行定量的方法及试剂盒。

[0012] 本发明涉及下述 [1] ~ [12]。

[0013] 一种样品中的 sdLDL-C 的定量方法,包括下述步骤 (i)、(ii) 和 (iii):

[0014] 步骤 (i):在含有表面活性剂 A 的反应液中,使该胆固醇酯水解酶和该胆固醇氧化酶、或者该胆固醇酯水解酶、该胆固醇脱氢酶和氧化型辅酶作用于样品,除去该样品中的 HDL-C、VLDL-C、CM-C 以及 LgLDL-C,其中,所述表面活性剂 A 为与由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 HDL-C、VLDL-C、CM-C 以及 LgLDL-C 的反应相比优先抑制由该胆固醇酯水解酶和该胆固醇氧化酶或者该胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应的表面活性剂;

[0015] 步骤 (ii):添加引发由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的、在所述步骤 (i) 的含有表面活性剂 A 的反应液中残留的 sdLDL-C 的反应的试剂,生成过氧化氢或者还原型辅酶,并测定所生成的过氧化氢或者还原型辅酶;以及

[0016] 步骤 (iii):使用含有已知浓度的 sdLDL-C 的标准样品,进行所述步骤 (i) 和 (ii),生成过氧化氢或者还原型辅酶,并测定所生成的过氧化氢或者还原型辅酶,将 sdLDL-C 浓度与过氧化氢或者还原型辅酶的测定值相关联,来确定该样品中的 sdLDL-C 浓度;

[0017] 其中,所述 sdLDL-C 表示小而密低密度脂蛋白中的胆固醇,所述 HDL-C 表示高密度脂蛋白中的胆固醇,所述 VLDL-C 表示极低密度脂蛋白中的胆固醇,CM-C 表示乳糜微粒中的胆固醇,LgLDL-C 表示大而轻低密度脂蛋白中的胆固醇。

[0018] 如 [1] 所述的方法,其中,引发由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的、在步骤 (i) 的含有表面活性剂 A 的反应液中残留的 sdLDL-C 的反应的试剂为表面活性剂 B,所述表面活性剂 B 是使由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应解除抑制的表面活性剂。

[0019] 如 [1] 或 [2] 所述的方法,其中,表面活性剂 A 是选自聚氧乙烯烷基胺、氧化胺类、烷基甜菜碱、烷基铵-1-丙磺酸盐、酰胺烷基甜菜碱、聚氧乙烯苄基-烷基季铵盐、聚氧乙烯脂肪酰胺、聚氧乙烯多环苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯脂肪酰胺硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基胺硫酸酯盐、N-酰基牛磺酸盐、N-酰基氨基酸盐、乙二胺-聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、不含有聚乙二醇的聚丙二醇衍生物、由下述通式 (I) 表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的表面活性剂,其中,所述聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的烷基为碳原子数 9 以下的烷基,

[0020] $\text{HO}-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_a-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_b-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_c-\text{H}$ (I)

[0021] 通式 (I) 中, a、b 及 c 相同或者不同, 表示 1 ~ 200 的整数。

[0022] 如 [1] ~ [3] 中任一项所述的方法, 其中, 表面活性剂 B 是选自聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯聚氧化烯烷基苯基醚、聚氧乙烯多环苯基醚、聚氧乙烯聚氧化烯多环苯基醚、由下述通式 (II) 表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及聚氧乙烯聚氧化烯烷基胺中的表面活性剂, 其中, 所述聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的烷基为碳原子数 10 以上的烷基,

[0023] $\text{HO}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_d-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_e-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_f-\text{H}$ (II)

[0024] 通式 (II) 中, d、e 及 f 相同或者不同, 表示 1 ~ 200 的整数。

[0025] 如 [1] ~ [4] 中任一项所述的方法, 其中, 在白蛋白存在下进行步骤 (i)。

[0026] 一种样品中的 sdLDL-C 定量用试剂盒, 其特征在于, 含有: (a) 第一试剂, 含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶以及过氧化氢除去试剂, 所述表面活性剂 A 为与由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶 - 氧化型辅酶引起的高密度脂蛋白中的胆固醇、极低密度脂蛋白中的胆固醇、乳糜微粒中的胆固醇以及大而轻低密度脂蛋白中的胆固醇的反应相比、优先抑制由该胆固醇酯水解酶和该胆固醇氧化酶或该胆固醇脱氢酶 - 该氧化型辅酶引起的小而密低密度脂蛋白中的胆固醇即 sdLDL-C 的反应的表面活性剂; (b) 第二试剂, 含有: 在表面活性剂 A 共存下引发由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶 - 氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应的试剂、以及过氧化氢测定试剂。

[0027] 一种样品中的 sdLDL-C 定量用试剂盒, 其特征在于, 含有: (a) 第一试剂, 含有: 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶以及胆固醇脱氢酶, 所述表面活性剂 A 为与由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶 - 氧化型辅酶引起的高密度脂蛋白中的胆固醇、极低密度脂蛋白中的胆固醇、乳糜微粒中的胆固醇以及大而轻低密度脂蛋白中的胆固醇的反应相比、优先抑制由该胆固醇酯水解酶和该胆固醇氧化酶或者该胆固醇脱氢酶 - 该氧化型辅酶引起的小而密低密度脂蛋白中的胆固醇即 sdLDL-C 的反应的表面活性剂; (b) 第二试剂, 含有: 在表面活性剂 A 共存下引发由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶 - 氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应的试剂。

[0028] 如 [6] 或 [7] 所述的试剂盒, 其中, 在表面活性剂 A 共存下引发由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶 - 氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应的试剂为表面活性剂 B, 所述表面活性剂 B 是使由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或者胆固醇脱氢酶 - 氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应解除抑制的表面活性剂。

[0029] 如 [6] ~ [8] 中任一项所述的试剂盒, 其中, 表面活性剂 A 是选自聚氧乙烯烷基胺、氧化胺类、烷基甜菜碱、烷基铵 -1- 丙磺酸盐、酰胺烷基甜菜碱、聚氧乙烯苄基 - 烷基季铵盐、聚氧乙烯脂肪酰胺、聚氧乙烯多环苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸酯盐、聚氧乙烯脂肪酰胺硫酸酯盐、聚氧乙烯烷基胺硫酸酯盐、N- 酰基牛磺酸盐、N- 酰基氨基酸盐、乙二胺 - 聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、不含有聚乙二醇的聚丙二醇衍生物、由下述通式 (I) 表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的表面活性剂, 其中, 所述聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的烷基为碳原子数 9 以下的烷基,

[0030] $\text{HO}-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_a-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_b-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_c-\text{H}$ (I)

[0031] 通式 (I) 中, a、b 及 c 相同或者不同, 表示 1 ~ 200 的整数。

[0032] 如 [6] ~ [9] 中任一项所述的试剂盒,其中,表面活性剂 B 是选自聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯聚氧化烯烷基苯基醚、聚氧乙烯多环苯基醚、聚氧乙烯聚氧化烯多环苯基醚、由下述通式 (II) 表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物、以及聚氧乙烯聚氧化烯烷基胺中的表面活性剂,其中,所述聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚中的烷基为碳原子数 10 以上的烷基,

[0033] $\text{HO}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_d-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_e-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_f-\text{H}$ (II)

[0034] 通式 (II) 中, d、e 及 f 相同或者不同,表示 1 ~ 200 的整数。

[0035] 如 [6] ~ [10] 中任一项所述的试剂盒,其中,至少在第一试剂中含有白蛋白。

[0036] 如 [6] ~ [11] 中任一项所述的试剂盒,其中,作为第三试剂,包含含有已知浓度的 sdLDL 的标准品。

[0037] 根据本发明,提供能够简便且准确地对样品中的 sdLDL-C 进行定量的方法及试剂盒。

具体实施方式

[0038] HDL-C、VLDL-C 及 CM-C 分别是将 HDL、VLDL 及 CM 中的游离型胆固醇与酯型胆固醇合并而得到的胆固醇。

[0039] 作为本发明的测定方法中使用的样品,可以列举例如全血、血浆、血清、脑脊液、唾液、羊水、尿、汗、胰液等,优选为血浆及血清。

[0040] 作为本发明胆固醇酯水解酶,只要是具有水解胆固醇酯的能力的酶则没有特别的限定,例如,除了来自动物、植物或者微生物的胆固醇酯酶、脂蛋白脂肪酶之外,还可以使用通过基因工程的方法制造的胆固醇酯酶、脂蛋白脂肪酶等。

[0041] 作为胆固醇酯水解酶,可以使用无修饰的胆固醇酯水解酶以及经过化学修饰的胆固醇酯水解酶。另外,作为胆固醇酯水解酶,也可以使用市售产品。

[0042] 作为市售的胆固醇酯水解酶,可以列举:胆固醇酯酶“Amano”2(CHE2;天野エンザイム公司制)、胆固醇酯酶“Amano”3(CHE3;天野エンザイム公司制)、脂蛋白脂肪酶“Amano”3(LPL-3;天野エンザイム公司制)、脂蛋白脂肪酶(LPL-311;东洋纺织公司制)、脂蛋白脂肪酶(LPL-312;东洋纺织公司制)、胆固醇酯酶(COE-301;东洋纺织公司制)、脂蛋白脂肪酶(LPBP;旭化成公司制)、胆固醇酯酶(CEBP-M;旭化成公司制)、胆固醇酯酶(CEN;旭化成公司制)、脂肪酶(LP;旭化成公司制)、脂肪酶(LPM;旭化成公司制)、脂肪酶(LPAP;旭化成公司制)、脂肪酶(LIPS;旭化成公司制)、胆固醇酯酶(CHE-BE;キッコーマン公司制)等。另外,本发明中,也可以组合使用 2 种以上的胆固醇酯水解酶。

[0043] 经过化学修饰的胆固醇酯水解酶中,作为修饰胆固醇酯水解酶的基团(化学修饰基团),可以列举例如:以聚乙二醇为主要成分的基团、以聚丙二醇为主要成分的基团、具有聚丙二醇和聚乙二醇的共聚物的基团、含有水溶性多糖类的基团、磺丙基、磺丁基、聚氨基酯基、具有螯合功能的基团等,优选以聚乙二醇为主要成分的基团。作为水溶性多糖类,可以列举例如右旋糖酐、普鲁兰多糖、可溶性淀粉等。

[0044] 作为用于化学修饰胆固醇酯水解酶的试剂(化学修饰剂),可以列举兼具上述化学修饰基团和能与酶的氨基、羧基、巯基等反应的官能团或结构的化合物等。作为能与酶中的氨基反应的官能团或结构,可以列举例如:羧基、活性酯基(N-羟基琥珀酰亚胺基等)、酸

酐、酰基氯、醛、环氧化物基、1,3-丙磺酸内酯、1,4-丁磺酸内酯等。作为能与酶中的羧基反应的官能团或结构,可以列举例如氨基等。作为能与酶中的巯基反应的基团或结构,可以列举例如马来酰亚胺基、二硫化物、 α -卤代酯(α -碘代酯等)等。

[0045] 作为化学修饰剂,也可以使用市售品。作为市售的化学修饰剂,可以列举:具有以聚乙二醇为主要成分的基团和N-羟基琥珀酰亚胺基のサンブライト VFM-4101、サンブライト ME-050AS、サンブライト DE-030AS(均为日本油脂公司制)、具有以聚乙二醇或据丙二醇等聚亚烷基二醇为主要成分的基团和酸酐结构的サンブライト AKM 系列(例如サンブライト AKM-1510 等)、サンブライト ADM 系列、サンブライト ACM 系列(均为日本油脂公司制)、具有以聚乙二醇为主要成分的基团和环氧基团的 EPOX-3400、M-EPOX-5000(均为 Sheamater Polymers 公司制)、具有螯合功能的基团和酸酐结构的二亚乙基三胺-N,N',N'',N''-五乙酸二酐(DTPA anhydride;同仁化学研究所公司制)等。

[0046] 胆固醇酯水解酶的化学修饰可以通过例如以下的方法来进行,但并不限于本方法。首先,将胆固醇酯水解酶溶解在 pH8.0 以上的缓冲液{例如 2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸(HEPES)缓冲液}中,在 0~55℃下添加 0.01~500 倍摩尔量的化学修饰剂,搅拌 5 分钟~5 小时。在实际的酶反应中,作为经过化学修饰的胆固醇酯水解酶,不仅限于该反应液本身,也可以使用根据需要利用超滤膜等除去未反应的化学修饰剂等而得到的液体。

[0047] 作为本反应的方法中使用的胆固醇酯水解酶的浓度,只要是能够进行本发明的 sdLDL-C 定量的浓度则没有特别的限制,在反应液中的浓度优选为 0.001~2000U/mL,更优选为 0.005~1000U/mL。

[0048] 作为本发明中的胆固醇氧化酶,只要是具有将胆固醇氧化而生成过氧化氢的能力的酶则没有特别的限制,例如,除了来自动物、植物或微生物的胆固醇氧化酶之外,也可以使用通过基因工程的方法制造的胆固醇氧化酶等,还可以使用胆固醇氧化酶“Amano”1(CHOD1;天野エンザイム公司制)、胆固醇氧化酶(CHO-PEL;キッコーマン公司制)、胆固醇氧化酶(CHO-PEWL;キッコーマン公司制)、胆固醇氧化酶(CHO-CE;キッコーマン公司制)、胆固醇氧化酶(C00321;东洋纺织公司制)、胆固醇氧化酶(C00-322;东洋纺织公司制)等市售品。另外,本发明中,也可以组合使用 2 种以上的胆固醇氧化酶。

[0049] 胆固醇氧化酶可以是无修饰的酶,也可以是经过化学修饰的酶。经过化学修饰的胆固醇氧化酶,例如可以使用前述化学修饰剂,通过前述化学修饰方法来制作。

[0050] 作为本反应的方法中使用的胆固醇氧化酶的浓度,只要是能够进行本发明的 sdLDL-C 定量的浓度则没有特别的限制,在反应液中的浓度优选为 0.001~2000U/mL,更优选为 0.005~1000U/mL。

[0051] 作为本发明中的胆固醇脱氢酶,只要是具有在氧化型辅酶存在下将胆固醇氧化而生成还原型辅酶的能力的酶则没有特别的限制,例如,除了来自动物、植物或微生物的胆固醇脱氢酶之外,也可以使用通过基因工程的方法制造的胆固醇脱氢酶等。还可以使用胆固醇脱氢酶“Amano”5(CHDH5;天野エンザイム公司制)等市售品。另外,本发明中,也可以组合使用 2 种以上的胆固醇脱氢酶。

[0052] 胆固醇脱氢酶可以是无修饰的酶,也可以是经过化学修饰的酶。经过化学修饰的胆固醇脱氢酶,例如可以使用前述化学修饰剂,通过前述化学修饰方法来制作。

[0053] 作为本反应的方法中使用的胆固醇脱氢酶的浓度,只要是能够进行本发明的 sdLDL-C 定量的浓度则没有特别的限制,在反应液中的浓度优选为 0.001 ~ 2000U/mL,更优选为 0.005 ~ 1000U/mL。

[0054] 作为在使用胆固醇脱氢酶的定量中使用的氧化型辅酶,可以列举例如 NAD(P)⁺、thio-NAD(P)⁺ 等。作为通过在氧化型辅酶共存下胆固醇脱氢酶与脂蛋白中的胆固醇之间的反应而生成的还原型辅酶,可以列举例如 NAD(P)H、thio-NAD(P)H 等。

[0055] 作为本发明的方法中使用的氧化型辅酶的浓度,只要是能够进行本发明的 sdLDL-C 定量的浓度则没有特别的限制,在反应液中的浓度优选为 0.01 ~ 400 毫摩尔/L,更优选为 0.1 ~ 1000 毫摩尔/L。

[0056] 本发明的 sdLDL-C 的定量方法中,也可以使用还原型辅酶氧化酶。在此,还原型辅酶氧化酶与胆固醇脱氢酶、氧化型辅酶一起使用,将通过在氧化型辅酶共存下胆固醇脱氢酶与脂蛋白中的胆固醇之间的反应而生成的还原型辅酶转变为过氧化氢。作为还原型辅酶氧化酶,可以列举例如 NAD(P)H 氧化酶等。作为还原型辅酶氧化酶,也可以使用市售品。作为市售的还原型辅酶氧化酶,可以列举 NADH 氧化酶(CosmoBio 公司制)等。

[0057] 作为本发明的方法中使用的还原型辅酶氧化酶的浓度,只要是能够进行本发明的 sdLDL-C 定量的浓度则没有特别的限制,在反应液中的浓度优选为 0.01 ~ 400U/mL,更优选为 0.02 ~ 200U/mL。

[0058] 作为本发明中使用的白蛋白,只要是能够进行本发明的 sdLDL-C 定量的白蛋白则没有特别的限制,可以列举例如来自牛、马、羊、人的白蛋白等,优选牛血清白蛋白(BSA)。另外,也可以使用通过基因工程的方法制造的白蛋白。本发明中,也可以组合使用 2 种以上的白蛋白。作为本发明 sdLDL-C 定量中的白蛋白的浓度,只要是能够进行本发明的 sdLDL-C 定量的浓度则没有特别的限制,在反应液中的浓度优选为 0.001 ~ 10%,更优选为 0.01 ~ 5%。

[0059] 本发明中的表面活性剂 A 具有抑制由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应、而使 LgLDL-C 的反应进行的性质。具体而言,表面活性剂 A 是与由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 HDL-C、VLDL-C、CM-C 及 LgLDL-C 的反应相比、优先抑制由该胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应的表面活性剂,在步骤(i)中,用于除去 sdLDL-C 以外的 HDL-C、VLDL-C、CM-C 和 LgLDL-C。以下,有时将 HDL-C、VLDL-C、CM-C 和 LgLDL-C 总称为 sdLDL-C 以外的脂蛋白中的胆固醇。

[0060] 作为表面活性剂 A,可以列举例如:聚氧乙烯烷基胺(以下简记为 POE 烷基胺)、氧化胺类、烷基甜菜碱、烷基铵-1-丙磺酸盐、酰胺烷基甜菜碱、聚氧乙烯苄基-烷基季铵盐(以下简记为 POE 苄基-烷基季铵盐)、聚氧乙烯脂肪酰胺(以下简记为 POE 脂肪酰胺)、聚氧乙烯多环苯基醚硫酸酯盐(以下简记为 POE 多环苯基醚硫酸酯盐)、聚氧乙烯烷基苯基醚硫酸酯盐(以下简记为 POE 烷基苯基醚硫酸酯盐)、聚氧乙烯脂肪酰胺硫酸酯盐(以下简记为 POE 脂肪酰胺硫酸酯盐)、聚氧乙烯烷基胺硫酸酯盐(以下简记为 POE 烷基胺硫酸酯盐)、N-酰基牛磺酸盐、N-酰基氨基酸盐、乙二胺-聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物(以下简记为乙二胺-POE/POP 缩合物)、不含有聚乙二醇的聚丙二醇衍生物(以下简记为 PPG 衍生物)、由下述通式(I)表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物(以下简记为 POE/POP 缩合物)、以及聚氧

乙烯聚氧化烯烷基醚（该烷基为碳原子数 9 以下的烷基）（以下简记为 C9 以下的 POE/POA 烷基醚）等。

[0061] $\text{HO}-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_a-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_b-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_c-\text{H}$ (I)

[0062] （通式 (I) 中，a、b 及 c 相同或者不同，表示 1 ~ 200 的整数）。

[0063] 作为 POE 烷基胺、烷基甜菜碱、烷基铵-1-丙磺酸盐、酰胺烷基甜菜碱、POE 烷基苯基醚硫酸酯盐、POE 烷基胺硫酸酯盐中的烷基，可以列举例如碳原子数 1 ~ 30 的甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基（月桂基）、十三烷基、十四烷基（肉豆蔻基）、十五烷基、十六烷基（鲸蜡基）、十七烷基、十八烷基（硬脂基）、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基（山嵛基）、二十三烷基、二十四烷基、二十五烷基、二十六烷基、二十七烷基、二十八烷基、二十九烷基、三十烷基等。

[0064] 作为 POE 烷基胺的市售品，可以列举：バイオニン D-3104、バイオニン D-3110、バイオニン D-3120（以上为竹本油脂公司制）、ナイミーン L-207（以上为日本油脂公司制）、BLAUNON L-205（以上为青木油脂公司制）等。

[0065] 作为氧化胺类，可以列举例如烷基氧化胺、聚氧乙烯烷基氧化胺（以下简记为 POE 烷基氧化胺）等。作为烷基氧化胺、POE 烷基氧化胺中的烷基，可以列举例如取代或未取代的碳原子数 1 ~ 30 的烷基等。作为该烷基，可以列举前述的烷基等。作为该取代基，可以列举例如羟基等。作为氧化胺类的市售品，可以列举：ユニセーフ A-LE、ユニセーフ A-LM、ユニセーフ A-LY（以上为日本油脂公司制）等。

[0066] 作为烷基甜菜碱的市售品，可以列举：ニツサンアノン BL、ニツサンアノン BF（以上为日本油脂公司制）、アンヒトール 24B、アンヒトール 86B（以上为花王公司制）等。

[0067] 作为烷基铵-1-丙磺酸盐的市售品，可以列举：ZWITTERGENT3-10、ZWITTERGENT3-12（以上为 CALBIOCHEM 公司制）等。

[0068] 作为酰胺烷基甜菜碱的市售品，可以列举アノン BDF-SF（日本油脂公司制）等。

[0069] 作为 POE 苄基-烷基季胺盐的市售品，可以列举ビスノール（一方社公司制）等。

[0070] 作为 POE 脂肪酰胺的市售品，可以列举ナイミツド MT-215（日本油脂公司制）、ニツコール TAMDS15（日光化学公司制）等。

[0071] 作为 POE 多环苯基醚硫酸酯盐中的多环苯基，可以列举：由 2 个以上基团内具有 1 个芳香环的基团（取代基）取代的苯基、由 1 个或多个基团内具有 2 个以上芳香环的基团（取代基）取代的苯基等。作为基团内具有 1 个芳香环的基团，可以列举例如苄基、1-（苄基）乙基等。作为基团内具有 2 个以上芳香环的基团，可以列举例如萘基等。作为 POE 多环苯基醚硫酸酯盐的市售品，可以列举：ニユーコール 707-SF、ニユーコール 707-SFC、ニユーコール 707-SN、ニユーコール 723-SF（以上为日本乳化剂公司制）等。

[0072] 作为 POE 烷基苯基醚硫酸酯盐的市售品，可以列举：ハイテノール N-07、ハイテノール N-08、ハイテノール N-17（以上为第一工业药品公司制）等。

[0073] 作为 POE 脂肪酰胺硫酸酯盐的市售品，可以列举サンアミド CF-3、サンアミド CF-10（以上为日本油脂公司制）等。

[0074] 作为 POE 烷基胺硫酸酯盐的市售品，可以列举ミグノール PA-30（一方社公司制）等。

[0075] 作为 N-酰基牛磺酸盐的市售品，可以列举：ニツコール CMT-30、ニツコール

PMT(以上为日光化学公司制)、ダイヤボン T 浆、ダイヤボン T 粉末、ダイヤボン K、ダイヤボン LM、ダイヤボン K-MG(以上为日本油脂公司制)等。

[0076] 作为 N-酰基氨基酸盐中的氨基酸,可以列举肌氨酸、丙氨酸等。作为 N-酰基氨基酸盐的市售品,可以列举:サルコシネート LN-30、サルコシネート CN-30、サルコシネート LK-30、アラニネート

[0077] LN-30(以上为日光化学公司制)、フィレット L(日本油脂公司制)等。

[0078] 作为乙二胺-POE/POP 缩合物的市售品,可以列举:アデカプルロニック TR-701、アデカプルロニック TR-702、アデカプルロニック TR-704、アデカプルロニック TR-913R(以上为旭电化公司制)、ユニループ 32TY-65BI(日本油脂公司制)等。

[0079] 作为不含有聚乙二醇的 PPG 衍生物,可以列举:聚丙二醇(以下简记为 PPG)、聚氧丙烯烷基醚(以下简记为 POP 烷基醚)等。作为 PPG,例如优选分子量为 1200 以下的 PPG。作为分子量为 1200 以下的 PPG 的市售品,可以列举:ユニオール D-700(日本油脂公司制)、ニユーポール PP-400(三洋化成公司制)等。作为 POP 烷基醚的市售品,可以列举ユニループ MB-2(日本油脂公司制)等。

[0080] 作为由下述通式(I)表示的 POE/POP 缩合物的市售品,可以列举:プルロニック 25R-1、プルロニック 25R-2(以上为旭电化公司制)、BLAUNON EP-0480、BLAUNON EP-0670、BLAUNON EP-1461(以上为青木油脂公司制)等。

[0081] $\text{HO}-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_a-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_b-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_c-\text{H}$ (I)

[0082] (通式(I)中,a、b及c相同或者不同,表示1~200的整数)。

[0083] 作为 C9 以下的 POE/POP 烷基醚中的烷基,可以列举例如:甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基等。作为 C9 以下的 POE/POP 烷基醚的市售品,可以列举:ユニループ 50MB-26、ユニループ 50MB-72(以上为日本油脂公司制)等。

[0084] 本发明中,表面活性剂 A 不仅限于 1 种,也可以组合使用 2 种以上。

[0085] 通过本申请,公开了存在显示如下作用的表面活性剂:抑制由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 sdLDL 胆固醇的反应,而使 LgLDL 胆固醇的反应进行。除了上述例示的物质之外,本领域技术人员也可以根据下述判定容易地理解并选择本发明的表面活性剂 A 的具体例。根据该方法选择的表面活性剂也包含在本发明的表面活性剂 A 中。

[0086] 表面活性剂 A 的判定可以通过例如以下记载的方法来进行。

[0087] 1) 脂蛋白组分的分离

[0088] 利用比重对血清中的 HDL、VLDL、CM、LgLDL、sdLDL 各组分进行分离纯化。具体而言,按照“新生化学实验讲座 4”(东京化学同人)记载的超速离心法,由人血清中分离提取出 HDL(比重为 1.063 以上)、sdLDL(比重为 1.044~1.063)、LgLDL(比重为 1.006~1.044)、VLDL 和 CM(比重为 1.006 以下)这 4 种脂蛋白组分。

[0089] 2) 表面活性剂 A 的判定用试剂

[0090] 例 1

[0091] 缓冲液,例如 MOPS(pH7.0)

[0092] 胆固醇酯水解酶,例如 LPL3

[0093] 胆固醇氧化酶,例如 CHO-PEL

[0094] 过氧化氢测定试剂,例如过氧化物酶、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰乙二胺(EMSE)及4-氨基安替比林(4-AA)

[0095] 要研究的表面活性剂

[0096] 例 2

[0097] 缓冲液,例如 MOPS (pH7.0)

[0098] 胆固醇酯水解酶,例如 LPL3

[0099] 胆固醇脱氢酶,例如 CHDH5

[0100] 氧化型辅酶,例如 NAD

[0101] [根据需要选用的还原型辅酶测定试剂,例如 2-(4-碘苯基)-3-(2,4-二硝基苯基)-5-(2,4-二磺苯基)-2H-四唑单钠盐(WST-3)]

[0102] 要研究的表面活性剂

[0103] 例 3

[0104] 缓冲液,例如 MOPS (pH7.0)

[0105] 胆固醇酯水解酶,例如 LPL3

[0106] 胆固醇脱氢酶,例如 CHDH5

[0107] 氧化型辅酶,例如 NAD

[0108] 还原型辅酶氧化酶,例如 NADH 氧化酶

[0109] 过氧化氢测定试剂,例如过氧化物酶、EMSE 及 4-AA

[0110] 要研究的表面活性剂

[0111] 另外,上述各试剂中,根据需要也可以含有后述的水性介质、稳定剂、防腐剂、影响物质消除剂、反应促进剂等。

[0112] 3) 表面活性剂 A 判定方法

[0113] 将各脂蛋白组分作为样品添加到反应池(2 μL)中,接着添加上述 2) 中记载的试剂(0.15mL),使反应开始,在 37℃ 下加热 5 分钟,测定反应液的吸光度呈直线增加的时间、例如反应 5 分钟后的反应液的吸光度变化($\Delta E_{\text{脂蛋白组分}}$)。

[0114] 使用生理盐水代替各脂蛋白组分作为样品,进行同样的测定,计算出吸光度变化($\Delta E_{\text{空白}}$),根据下述(式 1)计算出各脂蛋白组分中的“反应吸光度 1”。

[0115] $\text{反应吸光度 1} = \Delta E_{\text{脂蛋白组分}} - \Delta E_{\text{空白}}$ (式 1)

[0116] 对于各脂蛋白组分,利用日立 7170S 型自动分析装置,并使用总胆固醇定量用试剂盒デタミナ-C TC(协和梅迪克斯公司制),同样地操作,计算出“反应吸光度 2”。

[0117] 然后,根据下述(式 2)计算出各脂蛋白组分的反应率。

[0118] $\text{反应率}(\%) = \text{反应吸光度 1} / \text{反应吸光度 2} \times 100$ (式 2)

[0119] 选择 sdLDL 组分的反应率低、LgLDL 组分的反应率高的表面活性剂,优选选择 sdLDL 组分的反应率低、HDL、VLDL、CM 及 LgLDL 组分的反应率高的表面活性剂作为表面活性剂 A。

[0120] 与由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 HDL-C、VLDL-C、CM-C 及 LgLDL-C 的反应相比、优先抑制由该胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应,是指相对于 HDL、VLDL、CM 及 LgLDL 各组分胆固醇的反应率, sdLDL 组分胆固醇的反应率更小, sdLDL 组分胆固醇的反应率相对

于 HDL、VLDL、CM 及 LgLDL 各组分胆固醇的反应率的比例,优选为 50%以下,更优选为 20%以下,特别优选为 10%以下。

[0121] 另外,所使用的酶的种类及浓度等反应条件不同时,有时表面活性剂的反应性也不同,可以在设定的条件下判断作为研究对象的表面活性剂是否能够在本发明中作为表面活性剂 A 使用。

[0122] 本发明的 sdLDL-C 的定量方法中的表面活性剂 A 的浓度,优选为能够优先除去 sdLDL 以外的脂蛋白即 HDL、VLDL、CM 及 LgLDL 中的胆固醇的浓度,在反应液中的浓度优选为 0.0001 ~ 1%,更优选为 0.0005 ~ 0.5%。

[0123] 本发明中引起 sdLDL-C 的反应的试剂,在样品与胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶在表面活性剂 A 存在下反应、除去 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇后,能够使由胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的、反应液中残留的 sdLDL-C 的反应进行。具体可以列举:在表面活性剂 B 和表面活性剂 A 存在下能够与 sdLDL-C 反应的酶等。所述表面活性剂 B,是使由在表面活性剂 A 存在下用于除去 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇的胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶-氧化型辅酶引起的 sdLDL-C 的反应解除抑制的表面活性剂。

[0124] 作为本发明中的表面活性剂 B,可以列举例如:聚氧乙烯烷基醚(以下简记为 POE 烷基醚)、聚氧乙烯聚氧化烯烷基醚(该烷基为碳原子数 10 以上的烷基)(以下简记为 C10 以上的 POE/POA 烷基醚)、聚氧乙烯烷基苯基醚(以下简记为 POE 烷基苯基醚)、聚氧乙烯聚氧化烯烷基苯基醚(以下简记为 POE/POA 烷基苯基醚)、聚氧乙烯多环苯基醚(以下简记为 POE 多环苯基醚)、聚氧乙烯聚氧化烯多环苯基醚(以下简记为 POE/POA 多环苯基醚)、由下述通式 (II) 表示的聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物(以下简记为 POE/POP 缩合物)、以及聚氧乙烯聚氧化烯烷基胺(以下简记为 POE/POA 烷基胺)等。

[0125] $\text{HO}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_d-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_e-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_f-\text{H}$ (II)

[0126] (通式 (II) 中, d、e 及 f 相同或者不同,表示 1 ~ 200 的整数)。

[0127] 作为 POE 烷基醚,优选为 HLB 低于 15.0 的 POE 烷基醚(该烷基为碳原子数 20 以下的烷基)。作为 HLB 低于 15.0 的 POE 烷基醚(该烷基为碳原子数 20 以下的烷基)中的烷基,可以列举例如:甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、异癸基、十一烷基、十二烷基(月桂基)、十三烷基、十四烷基(肉豆蔻基)、十五烷基、十六烷基(鲸蜡基)、己基癸基、十七烷基、十八烷基(硬脂基)、十九烷基、二十烷基、辛基十二烷基等。作为 HLB 低于 15.0 的 POE 烷基醚(该烷基为碳原子数 20 以下的烷基)的市售品,可以列举:モリノール L-80(HLB13.1;碳原子数 12)(モーリン化学公司制)、エマルミン NL-80(HLB13.1;碳原子数 12)、エマルミン NL-90(HLB13.6;碳原子数 12)、エマルミン NL-100(HLB14.0;碳原子数 12)、エマルミン NL-110(HLB14.4;碳原子数 12)(以上为三洋化成公司制)、ノイゲン TDS-80(HLB13.3;碳原子数 13)、ノイゲン TDS-120(HLB14.8;碳原子数 13)(以上为第一工业制药公司制)、EMALEX1615(HLB13.0;碳原子数 16)、EMALEX1820(HLB14.0;碳原子数 18)、EMALEXOD-16(HLB 12.0;碳原子数 20)(以上为日本エマルジョン公司制)等。

[0128] 作为 C10 以上的 POE/POA 烷基醚,优选为 HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数在 10 以上 20 以下的 POE/POA 烷基醚。作为 HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数在 10 以上 20 以下的 POE/POA 烷基醚中的烷基,可以列举例如:癸基、异癸基、十一烷基、十二烷基(月桂基)、

十三烷基、十四烷基（肉豆蔻基）、十五烷基、十六烷基（鲸蜡基）、己基癸基、十七烷基、十八烷基（硬脂基）、十九烷基、二十烷基、辛基十二烷基等。作为 HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数在 10 以上 20 以下的 POE/POA 烷基醚中的聚氧化烯，可以列举聚氧乙烯以外的、例如聚氧丙烯、聚氧丁烯等。作为 HLB 低于 15.0 且烷基的碳原子数在 10 以上 20 以下的 POE/POA 烷基醚的市售品，可以列举例如：ワンドサーフ ID-50 (HLB10.5；碳原子数 10)、ワンドサーフ ID-70 (HLB12.1；碳原子数 10)、ワンドサーフ ID-90 (HLB13.3；碳原子数 10)、ワンドサーフ S-800 (HLB12.3；碳原子数 13)、ワンドサーフ S-1000 (HLB13.2；碳原子数 13)、ワンドサーフ S-1400 (HLB14.4；碳原子数 13)（以上为青木油脂公司制）等。

[0129] 作为 POE 烷基苯基醚，优选为 HLB 低于 16.0 的 POE 烷基苯基醚。作为 HLB 低于 16.0 的 POE 烷基苯基醚中的烷基，可以列举碳原子数 1～30 的、例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基（月桂基）、十三烷基、十四烷基（肉豆蔻基）、十五烷基、十六烷基（鲸蜡基）、十七烷基、十八烷基（硬脂基）、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基（山嵛基）、二十三烷基、二十四烷基、二十五烷基、二十六烷基、二十七烷基、二十八烷基、二十九烷基、三十烷基等。作为 HLB 低于 16.0 的 POE 烷基苯基醚的市售品，可以列举：ノニオン NS-210 (HLB 13.3)、ノニオン NS-212 (HLB14.1)、ノニオン NS-215 (HLB15.0)、ノニオン HS-210 (HLB13.6)（以上为日本油脂公司制）、エマルゲン 911 (HLB13.7)、エマルゲン 913 (HLB 14.5)（以上为花王公司制）等。

[0130] 作为 POE/POA 烷基苯基醚，优选为 HLB 低于 16.0 的 POE/POA 烷基苯基醚。作为 HLB 低于 16.0 的 POE/POA 烷基苯基醚中的烷基，可以列举碳原子数 1～30 的、例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基（月桂基）、十三烷基、十四烷基（肉豆蔻基）、十五烷基、十六烷基（鲸蜡基）、十七烷基、十八烷基（硬脂基）、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基（山嵛基）、二十三烷基、二十四烷基、二十五烷基、二十六烷基、二十七烷基、二十八烷基、二十九烷基、三十烷基等。作为 HLB 低于 16.0 的 POE/POA 烷基苯基醚中的聚氧化烯，可以列举聚氧乙烯以外的、例如聚氧丙烯、聚氧丁烯等。作为 HLB 低于 16.0 的 POE/POA 烷基苯基醚的市售品，可以列举：アクロネセス KP-189R、デイスパノール LS-100（以上为日本油脂公司制）、エマルゲン L-40（花王公司制）等。

[0131] 作为 POE 多环苯基醚，优选为 HLB 低于 13.0 的 POE 多环苯基醚。作为 HLB 低于 13.0 的 POE 多环苯基醚中的多环苯基，可以列举：由 2 个以上基团内具有 1 个芳香环的基团（取代基）取代的苯基、由 1 个或多个基团内具有 2 个以上芳香环的基团（取代基）取代的苯基等。作为基团内具有 1 个芳香环的基团，可以列举例如苄基、1-（苯基）乙基等。作为基团内具有 2 个以上芳香环的基团，可以列举例如萘基等。作为 HLB 低于 13.0 的 POE 多环苯基醚的市售品，可以列举：エマルゲン A-60 (HLB12.8)（花王公司制）、BLAUNON DSP-9 (HLB11.4)、BLAUNON DSP-12.5 (HLB12.8)（以上为青木油脂公司制）、ニューコール 2607 (HLB11.8)（日本乳化剂公司制）等。

[0132] 作为 POE/POA 多环苯基醚，优选为 HLB 低于 13.0 的 POE/POA 多环苯基醚。作为 HLB 低于 13.0 的 POE/POA 多环苯基醚中的多环苯基，可以列举：由 2 个以上基团内具有 1 个芳香环的基团（取代基）取代的苯基、由 1 个或多个基团内具有 2 个以上芳香环的基团（取代基）取代的苯基等。作为基团内具有 1 个芳香环的基团，可以列举例如苄基、1-（苯基）乙基等。作为基团内具有 2 个以上芳香环的基团，可以列举例如萘基等。作为 HLB 低

于 13.0 的 POE/POA 多环苯基醚中的聚氧化烯,可以列举聚氧乙烯以外的、例如聚氧丙烯、聚氧丁烯等。作为 HLB 低于 13.0 的 POE/POA 多环苯基醚的市售品,可以列举ニユーコール 707F(HLB12.4)(以上为日本乳化剂公司制)等。

[0133] 作为由下述通式 (II) 表示的 POE/POP 缩合物,优选 POP 分子量为 1200 以上且 POE 含量为 60% 以下的 POE/POP 缩合物。



[0135] (通式 (II) 中, d、e 以及 f 相同或者不同,表示 1 ~ 200 的整数)。作为 POP 分子量为 1200 以上且 POE 含量为 60% 以下的 POE/POP 缩合物的市售品,可以列举:プロノン 204(POP 分子量:2000;POE 含量:40%)(日本油脂公司制)、ニユーポール PE-62(POP 分子量:1750;POE 含量:20%)、ニユーポール PE-64(POP 分子量:1750;POE 含量:40%)、ニユーポール PE-71(POP 分子量:2050;POE 含量:10%)、ニユーポール PE-75(POP 分子量:2050;POE 含量:50%)(以上为三洋化成公司制)、プルロニツク P-84(POP 分子量:2250;POE 含量:40%)、プルロニツク P-85(POP 分子量:2250;POE 含量:50%)、プルロニツク P-103(POP 分子量:3250;POE 含量:30%)(以上为旭电化公司制)等。

[0136] 作为 POE/POA 烷基胺中的烷基,可以列举碳原子数 1 ~ 30 的、例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基(月桂基)、十三烷基、十四烷基(肉豆蔻基)、十五烷基、十六烷基(鲸蜡基)、十七烷基、十八烷基(硬脂基)、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基(山嵛基)、二十三烷基、二十四烷基、二十五烷基、二十六烷基、二十七烷基、二十八烷基、二十九烷基、三十烷基等。作为 POE/POA 烷基胺中的聚氧化烯,可以列举聚氧乙烯以外的、例如聚氧丙烯、聚氧丁烯等。作为 POE/POA 烷基胺的市售品,可以列举:BLAUNON LPE1007(青木油脂公司制)、烷基(C16)胺 E020P010(日本油脂公司制)等。

[0137] 本发明中,表面活性剂 B 并不仅限于 1 种,可以组合使用 2 种以上。

[0138] 另外,本领域技术人员可以根据本发明的实施例 2 所示的方法等,适当把握、选择提高 sdLDL 组分的反应率的表面活性剂作为表面活性剂 B。所使用的酶的种类及浓度等反应条件不同时,有时表面活性剂的反应性也不同,可以在设定的条件下判断作为研究对象的表面活性剂是否能够在本发明中作为表面活性剂 B 使用。

[0139] 本发明的 sdLDL-C 的定量方法中的表面活性剂 B 的浓度,是能够进行 sdLDL-C 定量的浓度,在反应液中的浓度优选为 0.001 ~ 5%,更优选为 0.01 ~ 0.5%。

[0140] 作为在表面活性剂 A 存在下能够进行与 sdLDL-C 的反应的酶,可以列举胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶或胆固醇脱氢酶等,优选胆固醇酯水解酶。使用胆固醇酯水解酶代替表面活性剂 B 时,作为该胆固醇酯水解酶,可以是与步骤 (i) 中使用的胆固醇酯水解酶相同种类的胆固醇酯水解酶,也可以是不同种类的胆固醇酯水解酶。使用相同种类的胆固醇酯水解酶时,在步骤 (ii) 中添加能够将残留的 sdLDL-C 定量的量的胆固醇酯水解酶即可。另外,使用不同种类的胆固醇酯水解酶时,只要是能够将残留的 sdLDL-C 定量的胆固醇酯水解酶,则没有特别的限制。

[0141] 另外,步骤 (ii) 中,作为引起 sdLDL-C 的反应的试剂,也可以使用酶与表面活性剂的组合。该组合只要是能够将除去 sdLDL 以外的脂蛋白后的反应液中残留的 sdLDL-C 定量的组合,则没有特别的限制。构成该组合的酶和表面活性剂,不需要单独使用时能够将残留

的 sdLDL-C 定量,只要通过组合使用能够将残留的 sdLDL-C 定量即可。

[0142] HLB 是指亲水-亲油平衡值。本发明中使用的表面活性剂、例如 POE 多环苯基醚的 HLB,通过表面活性剂手册(吉田时行等著,工业图书株式会社)或新表面活性剂(堀口博著,三共出版株式会社)中记载的方法能够算出。另外,作为该 HLB,也可以利用各种表面活性剂的制造厂家的商品目录或手册中记载的 HLB 值。

[0143] (sdLDL-C 定量方法)

[0144] 本发明的 sdLDL-C 定量方法是包括下述步骤(i)~(iii)的方法。

[0145] 步骤(i):在含有表面活性剂 A 的反应液中,使胆固醇酯水解酶和胆固醇氧化酶、或者胆固醇酯水解酶、胆固醇脱氢酶和氧化型辅酶作用于样品,除去该样品中的 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇;

[0146] 步骤(ii):添加引起所述步骤(i)后的反应液中残留的 sdLDL-C 的反应的试剂,生成过氧化氢或还原型辅酶,并测定所生成的过氧化氢或还原型辅酶;

[0147] 步骤(iii):使用含有已知浓度的 sdLDL-C 的标准样品,进行所述步骤(i)和(ii),生成过氧化氢或还原型辅酶,测定所生成的过氧化氢或还原型辅酶,将 sdLDL-C 浓度与过氧化氢或还原型辅酶浓度的测定值 相关联来确定该样品中的 sdLDL-C 浓度。

[0148] 另外,不进行步骤(iii)而进行步骤(i)和步骤(ii),也可以作为样品中的 sdLDL-C 的检测方法。

[0149] 作为步骤(i)中的除去样品中 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇的方法,可以列举例如:除去由该胆固醇转变而成的过氧化氢或通过该胆固醇而生成的还原型辅酶的方法。该除去方法优选为由该胆固醇生成过氧化氢、然后除去该过氧化氢的方法。

[0150] 该过氧化氢的除去可以通过使用例如过氧化氢除去试剂来进行。作为过氧化氢除去方法,优选为如下方法:使过氧化氢酶作用于过氧化氢,或者使过氧化活性物质与氧化偶合显色反应中使用的 2 种氧化偶合色素原的 1 种组合作用于过氧化氢。

[0151] 还原型辅酶的除去也可以通过例如使还原型辅酶氧化酶作用于还原型辅酶、使用过氧化氢除去试剂除去生成的过氧化氢来进行。

[0152] 作为过氧化氢除去试剂,只要能够将由 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇生成的过氧化氢转变为不影响由 sdLDL-C 生成的过氧化氢的测定的物质,则没有特别的限制,可以列举例如:含有过氧化氢酶的试剂、含有过氧化活性物质和氧化偶合型显色反应中使用的 2 种氧化偶合型色素原的 1 种的试剂等。作为过氧化活性物质,可以列举例如过氧化物酶等。氧化偶合型显色反应中使用的 2 种氧化偶合型色素原的 1 种,具体可以例示后述的“氧化偶合显色型色素原”中的偶合剂、或者苯胺类或苯酚类。本说明书中,“另一种氧化偶合型色素原”,是与“氧化偶合型显色反应中使用的 2 种氧化偶合型色素原的 1 种”对应使用的,例如,前者表示偶合剂时,后者表示苯酚类或苯胺类,前者表示苯酚类或苯胺类时,后者表示偶合剂。

[0153] 使用含有过氧化氢酶的试剂作为过氧化氢除去试剂时,过氧化氢酶的浓度优选为 0.001 ~ 5000kU/L,更优选为 0.01 ~ 1000kU/L。另外,本发明的步骤(i)中使用过氧化氢酶作为过氧化氢除去试剂时,优选在步骤(ii)中存在过氧化氢酶抑制剂。作为过氧化氢酶抑制剂,可以列举:叠氮化钠、H₂S、HCN、NH₂OH、3-氨基-1,2,4-三唑等。所使用的浓度,只要是能抑制过氧化氢酶活性、从而不影响在步骤(ii)中生成的过氧化氢的测定的浓度,则

没有特别的限定,优选为 0.5 ~ 60 毫摩尔 /L,更优选为 1 ~ 30 毫摩尔 /L。

[0154] 使用过氧化活性物质和氧化偶合型显色反应中使用的 2 种氧化偶合型色素原的 1 种作为过氧化氢除去试剂时,作为过氧化活性物质可以列举过氧化物酶等。过氧化物酶的浓度优选为 0.01 ~ 500kU/L,更优选为 1 ~ 100kU/L。作为氧化偶合型显色反应中使用的 2 种氧化偶合型色素原的 1 种的浓度,优选为 0.01 ~ 10g/L。

[0155] 另外,本发明中,步骤 (i) 中 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇的除去,并不限于将由该胆固醇生成的过氧化氢或还原型辅酶转变为其它物质来除去。例如,能够分别测定过氧化氢和还原型辅酶时,不需要将由该胆固醇生成的过氧化氢或还原型辅酶转变为其它物质。例如,在步骤 (i) 中由 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇生成还原型辅酶、在步骤 (ii) 中由 sdLDL 胆固醇生成过氧化氢时,不需要将步骤 (i) 中生成的还原型辅酶转变为其它物质。并且,本发明还包含:测定步骤 (i) 中生成的过氧化氢或还原型辅酶,根据得到的测定值,计算出步骤 (ii) 中生成的过氧化氢或还原型辅酶,由此对样品中的 sdLDL-C 进行定量。

[0156] 在此,过氧化氢的测定,可以使用例如过氧化氢电极或后述的过氧化氢测定试剂来进行,优选通过使过氧化活性物质和氧化显色型色素原作用于过氧化氢而生成色素、测定该色素的吸光度来进行的方法。

[0157] 还原型辅酶的测定,可以通过例如还原型辅酶的最大吸收附近的 波长处的吸光度测定、或者使用后述的还原型辅酶测定试剂的测定来进行。

[0158] 过氧化氢测定用试剂,是用于将生成的过氧化氢转变为能够检测的物质的试剂。作为能够检测的物质,可以列举例如色素、光等,优选色素。在能够检测的物质为色素时,过氧化氢测定用试剂含有氧化显色型色素原及过氧化物酶等过氧化活性物质。作为氧化显色型色素原,可以列举例如后述的氧化显色型色素原。在能够检测的物质为光时,过氧化氢测定用试剂含有化学发光物质。作为化学发光物质,可以列举例如:鲁米诺、异鲁米诺、光泽精、吖啶酯等。

[0159] 使用含有氧化显色型色素原和过氧化活性物质的试剂作为过氧化氢测定用试剂时,过氧化氢在过氧化活性物质存在下与氧化显色型色素原反应而生成色素,测定所生成的色素,由此能够测定过氧化氢。另外,使用含有化学发光物质的过氧化氢测定用试剂时,过氧化氢与化学发光物质反应而产生光,测定所产生的光,由此能够测定过氧化氢。

[0160] 作为氧化显色型色素原,可以列举例如:无色型色素原、氧化偶合显色型色素原等。

[0161] 无色型色素原是在过氧化氢和过氧化活性物质存在下可单独转变为色素的物质。具体可以列举:10-N-羧基甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪(CCAP)、10-N-甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪(MCDP)、N-(羧基甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲基氨基)二苯基胺钠盐(DA-64)、4,4'-双(二甲基氨基)二苯基胺、双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基]胺(BCMA)等。

[0162] 氧化偶合显色型色素原是在过氧化氢和过氧化活性物质存在下由 2 种化合物进行氧化偶合而生成色素的物质。

[0163] 作为 2 种化合物的组合,可以列举:偶合剂与苯胺类的组合、偶合剂与苯酚类的组合等。

[0164] 作为偶合剂,可以列举例如:4-氨基安替比林(4-AA)、3-甲基-2-苯并噻唑啉酮

胍等。

[0165] 作为苯胺类,可以列举:N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺(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-(3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOPS)、N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(HDAOS)、N,N-二甲基-3-甲基苯胺、N,N-双(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰乙二胺(EMSE)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙酰基乙二胺(EMSE)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺(F-DAOS)等。

[0166] 作为苯酚类,可以列举:苯酚、4-氯苯酚、3-甲基苯酚、3-羟基-2,4,6-三碘苯甲酸(HTIB)等。

[0167] 还原型辅酶测定试剂是用于将生成的还原型辅酶转变为能够检测的物质的试剂。作为能够检测的物质,可以列举例如色素等。能够检测的物质为色素时,还原型辅酶测定试剂含有还原显色型色素原。作为还原显色型色素原,可以列举例如:3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑溴化物(MTT)、2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四唑单钠盐(WST-1)、2-(4-碘苯基)-3-(2,4-二硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四唑单钠盐(WST-3)等。

[0168] 过氧化氢的测定中,作为过氧化活性物质,可以列举例如过氧化物酶等。过氧化活性物质的浓度只要是适于进行测定的浓度则没有特别的限制,在使用过氧化物酶作为过氧化活性物质时,优选为1~100kU/L。另外,氧化显色型色素原的浓度只要是适于进行测定的浓度则没有特别的限制,优选为0.01~10g/L。

[0169] 本发明中,sdLDL-C的测定优选在水性介质中进行。作为水性介质,可以列举例如去离子水、蒸馏水、缓冲液等,优选为缓冲液。作为缓冲液中使用的缓冲剂,可以列举例如:三(羟甲基)氨基甲烷缓冲剂、磷酸缓冲剂、硼酸缓冲剂、Good's缓冲剂等。

[0170] 作为Good's缓冲剂,可以列举例如:2-吗啉乙磺酸(MES)、双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷(Bis-Tris)、N-(2-乙酰胺)亚氨基二醋酸(ADA)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)、N-(2-乙酰胺)-2-氨基乙磺酸(ACES)、3-吗啉-2-羟基丙磺酸(MOPSO)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、3-吗啉丙磺酸(MOPS)、N-[三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸(TES)、2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸(HEPES)、3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸(DIPSO)、N-[三(羟甲基)甲基]-2-羟基-3-氨基丙磺酸(TAPSO)、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙磺酸)(POPSO)、3-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]-2-羟基丙磺酸(HEPPSO)、3-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]丙磺酸[(H)EPES]、N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸(Tricine)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(Bicine)、N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、N-环己基-3-氨基-2-羟基丙磺酸(CAPSO)、N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)等。缓冲液的浓度只要是适于进行测定的浓度则没有特别的限制,优选为0.001~2.0摩尔/L,更优选为0.005~1.0摩尔/L。

[0171] 用于确定试样中的sdLDL-C浓度的标准曲线可以通过例如下述方法制作:使用含

有已知浓度的 sdLDL-C 的标准样品,进行本发明的步骤 (i) 和步骤 (ii),生成过氧化氢或还原型辅酶,测定所生成的过氧化氢 或还原型辅酶,由该测定值和所使用的 sdLDL-C 浓度制作标准曲线。

[0172] 本发明的步骤 (i) 和步骤 (ii) 例如在 10 ~ 50℃、优选 20 ~ 40℃下进行 1 ~ 30 分钟、优选 2 ~ 15 分钟。

[0173] (sdLDL-C 定量用试剂盒)

[0174] 本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒,能够在本发明的 sdLDL-C 定量方法中使用。sdLDL-C 定量用试剂盒的形式,只要是能够实施本发明的 sdLDL-C 定量方法的形式则没有特别的限制,可以为 2 种试剂类、3 种试剂类等任何一种形式,优选为 2 种试剂类。

[0175] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒,可以列举例如以下的试剂盒:

[0176] 样品中的 sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶及过氧化氢除去试剂;第二试剂,含有引起 sdLDL-C 的反应的试剂及过氧化氢测定试剂。

[0177] 样品中的 sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶及胆固醇脱氢酶;第二试剂,含有引起 sdLDL-C 的反应的试剂。

[0178] sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶及还原型辅酶测定试剂;第二试剂,含有引起 sdLDL-C 的反应的试剂。

[0179] 样品中的 sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇脱氢酶、氧化型辅酶、还原型辅酶氧化酶及过氧化氢除去试剂;第二试剂,含有引起 sdLDL-C 的反应的试剂及过氧化氢测定试剂。

[0180] sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶及过氧化氢除去试剂;第二试剂,含有表面活性剂 B 及过氧化氢测定试剂。

[0181] sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶及胆固醇脱氢酶;第二试剂,含有表面活性剂 B。

[0182] sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶及还原型辅酶测定试剂;第二试剂,含有表面活性剂 B。

[0183] sdLDL-C 定量用试剂盒,其特征在于,含有:第一试剂,含有表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶及过氧化氢除去试剂;第二试剂,含有表面活性剂 B 及过氧化氢测定试剂。

[0184] 在由第一试剂和第二试剂构成的 2 种试剂类的 sdLDL-C 定量用试剂盒中,胆固醇酯水解酶在第一试剂中含有,但也可以在第一和第二试剂两者中均含有。胆固醇氧化酶在第一试剂中含有,但也可以在第一和第二试剂两者中均含有。胆固醇脱氢酶在第一试剂中含有,但也可以在第一和第二试剂两者中均含有。

[0185] 表面活性剂 A 优选在第一试剂中含有。

[0186] 氧化型辅酶在第一试剂中含有,但也可以在第一和第二试剂两者中均含有。还原

型辅酶氧化酶在第一试剂中含有,但也可以在第一和第二试剂两者中均含有。

[0187] 过氧化氢除去试剂优选在第一试剂中含有。使用过氧化氢酶作为 过氧化氢除去试剂时,过氧化氢酶优选在第一试剂中含有,过氧化氢酶抑制剂优选在第二试剂中含有。使用过氧化物酶与氧化偶合型显色反应中使用的 2 种氧化偶合型色素原的 1 种的组合作为过氧化氢除去试剂时,该组合优选在第一试剂中含有。

[0188] 表面活性剂 B 优选在第二试剂中含有。如前所述,也可以使用能够对在除去 sdLDL 以外的脂蛋白中的胆固醇后的反应液中残留的 sdLDL-C 进行定量的酶、或者酶与表面活性剂的组合来代替表面活性剂 B。

[0189] 使用含有过氧化物酶与 2 种氧化偶合型色素原的试剂作为过氧化氢测定试剂时,2 种氧化偶合型色素原优选分别在不同的试剂中含有。过氧化物酶在第一、第二试剂的任一者或两者中含有。另外,使用过氧化物酶与氧化偶合型显色反应中使用的 2 种氧化偶合型色素原的 1 种的组合作为过氧化氢除去试剂时,也可以将该组合与另一种偶合型色素原组合在一起作为过氧化氢测定试剂。另外,该另一种偶合型色素原在第二试剂中含有。

[0190] 白蛋白优选在第一试剂中含有,但也可以在第一和第二试剂两者中均含有。

[0191] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒,可以列举例如以下形式的试剂盒,但它们并不限定本发明的范围。

[0192] 试剂盒 1

[0193] 第一试剂

[0194] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化氢酶

[0195] 第二试剂

[0196] 表面活性剂 B、过氧化氢酶抑制剂、过氧化氢测定试剂

[0197] 试剂盒 2

[0198] 第一试剂

[0199] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原的 1 种

[0200] 第二试剂

[0201] 表面活性剂 B、另一种氧化偶合型色素原

[0202] 试剂盒 3

[0203] 第一试剂

[0204] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原

[0205] 第二试剂

[0206] 表面活性剂 B

[0207] 试剂盒 4

[0208] 第一试剂

[0209] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶

[0210] 第二试剂

[0211] 表面活性剂 B

[0212] 试剂盒 5

[0213] 第一试剂

- [0214] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶测定试剂
- [0215] 第二试剂
- [0216] 表面活性剂 B
- [0217] 试剂盒 6
- [0218] 第一试剂
- [0219] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶、过氧化氢酶
- [0220] 第二试剂
- [0221] 表面活性剂 B、过氧化氢酶抑制剂、过氧化氢测定试剂
- [0222] 试剂盒 7
- [0223] 第一试剂
- [0224] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原的 1 种
- [0225] 第二试剂
- [0226] 表面活性剂 B、另一种氧化偶合型色素原
- [0227] 试剂盒 8
- [0228] 第一试剂
- [0229] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化氢酶、白蛋白
- [0230] 第二试剂
- [0231] 表面活性剂 B、过氧化氢酶抑制剂、过氧化氢测定试剂
- [0232] 试剂盒 9
- [0233] 第一试剂
- [0234] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原的 1 种、白蛋白
- [0235] 第二试剂
- [0236] 表面活性剂 B、另一种氧化偶合型色素原
- [0237] 试剂盒 10
- [0238] 第一试剂
- [0239] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原、白蛋白
- [0240] 第二试剂
- [0241] 表面活性剂 B
- [0242] 试剂盒 11
- [0243] 第一试剂
- [0244] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、白蛋白
- [0245] 第二试剂
- [0246] 表面活性剂 B
- [0247] 试剂盒 12
- [0248] 第一试剂

- [0249] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶测定试剂、白蛋白
- [0250] 第二试剂
- [0251] 表面活性剂 B
- [0252] 试剂盒 13
- [0253] 第一试剂
- [0254] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶、过氧化氢酶、白蛋白
- [0255] 第二试剂
- [0256] 表面活性剂 B、过氧化氢酶抑制剂、过氧化氢测定试剂
- [0257] 试剂盒 14
- [0258] 第一试剂
- [0259] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原的 1 种、白蛋白
- [0260] 第二试剂
- [0261] 表面活性剂 B、另一种氧化偶合型色素原
- [0262] 试剂盒 15
- [0263] 第一试剂
- [0264] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化氢酶、白蛋白
- [0265] 第二试剂
- [0266] 表面活性剂 B、过氧化氢酶抑制剂、过氧化氢测定试剂、白蛋白
- [0267] 试剂盒 16
- [0268] 第一试剂
- [0269] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原的 1 种、白蛋白
- [0270] 第二试剂
- [0271] 表面活性剂 B、白蛋白、另一种氧化偶合型色素原
- [0272] 试剂盒 17
- [0273] 第一试剂
- [0274] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原、白蛋白
- [0275] 第二试剂
- [0276] 表面活性剂 B、白蛋白
- [0277] 试剂盒 18
- [0278] 第一试剂
- [0279] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、白蛋白
- [0280] 第二试剂
- [0281] 表面活性剂 B、白蛋白
- [0282] 试剂盒 19

[0283] 第一试剂

[0284] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶测定试剂、白蛋白

[0285] 第二试剂

[0286] 表面活性剂 B、白蛋白

[0287] 试剂盒 20

[0288] 第一试剂

[0289] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶、过氧化氢酶、白蛋白

[0290] 第二试剂

[0291] 表面活性剂 B、过氧化氢酶抑制剂、过氧化氢测定试剂、白蛋白

[0292] 试剂盒 21

[0293] 第一试剂

[0294] 表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶、过氧化物酶、氧化偶合型色素原的 1 种、白蛋白

[0295] 第二试剂

[0296] 表面活性剂 B、白蛋白、另一种氧化偶合型色素原

[0297] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中使用的表面活性剂 A、胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶、氧化型辅酶、胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶、过氧化氢除去试剂、表面活性剂 B、白蛋白、过氧化氢测定试剂,分别可以列举前面所述的物质。

[0298] 本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中,根据需要可以含有水性介质、稳定剂、防腐剂、影响物质消除剂、反应促进剂等。作为水性介质,可以列举例如前述的水性介质等。作为稳定剂,可以列举例如:乙二胺四乙酸(EDTA)、蔗糖、氯化钙等。作为防腐剂,可以列举例如:叠氮化钠、バイオエース(BIOACE)、抗生素等。作为影响物质消除剂,可以列举例如:用于消除抗坏血酸的影响的抗坏血酸氧化酶等。作为反应促进剂,可以列举例如:共脂肪酶等酶、硫酸钠、氯化钠等盐类等。

[0299] 本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒,可以为冷冻干燥的状态,也可以为溶解于水性介质的状态。使用冷冻干燥状态的试剂对样品中的 sdLDL-C 进行定量时,将该试剂溶解于水性介质中使用。

[0300] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中的胆固醇酯水解酶、胆固醇氧化酶的含量,优选在用水性介质溶解的状态下的浓度为 0.001 ~ 2000U/mL 的含量,更优选为 0.005 ~ 1000U/mL 的含量。

[0301] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中的胆固醇脱氢酶、还原型辅酶氧化酶的含量,优选在用水性介质溶解的状态下的浓度为 0.001 ~ 2000U/mL 的含量,更优选为 0.005 ~ 1000U/mL 的含量。

[0302] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中的氧化型辅酶的含量,优选在用水性介质溶解的状态下的浓度为 0.01 ~ 500 毫摩尔/mL 的含量,更优选为 0.1 ~ 100 毫摩尔/mL 的含量。

[0303] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中的表面活性剂 A 的含量,优选在用水性介

质溶解的状态下的浓度为 0.0001 ~ 1% 的含量,更优选为 0.0005 ~ 0.5% 的含量。

[0304] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中的表面活性剂 B 的含量,优选在用水性介质溶解的状态下的浓度为 0.001 ~ 5% 的含量,更优选为 0.01 ~ 0.5% 的含量。

[0305] 作为本发明的 sdLDL-C 定量用试剂盒中的白蛋白的含量,优选在用水性介质溶解的状态下的浓度为 0.0001 ~ 10%,更优选为 0.001 ~ 5%。

[0306] 下面,通过实施例对本发明进行更具体的说明,但这些实施例并不限定本发明的范围。另外,本实施例和参考例中,使用下述生产厂家的试剂和酶。

[0307] MOPS(同仁化学研究所公司制)、EMSE(ダイドーケミックス公司制)、硫酸钠(关东化学公司制)、4-氨基安替比林(埼玉化成公司制)、过氧化物酶(东洋纺织公司制)、CHO-PEL(胆固醇氧化酶;キツコーマン公司制)、CHO-CE(胆固醇氧化酶;キツコーマン公司制)、C00-322(胆固醇氧化酶;东洋纺织公司制)、LPL3(胆固醇酯水解酶;天野エンザイム公司制)、LP(胆固醇酯水解酶;旭化成公司制)、LIPS(胆固醇酯水解酶;旭化成公司制)、LPAP(胆固醇酯水解酶;旭化成公司制)、过氧化物酶(东洋纺织公司制)、BSA(Proliant 公司制)。

[0308] パイオニン D-3110(竹本油脂公司制)、パイオニン D-3120(竹本油脂公司制)、ナイミーン L-207(日本油脂公司制)、ユニセーフ AL-E(日本油脂公司制)、ZWITTERGENT 3-10(CALBIOCHEM 公司制)、ニツサンアノン BL(日本油脂公司制)、アノン BDF-SF(日本油脂公司制)、ビスノール SK(一方社公司制)、ナイミツド MT-215(日本油脂公司制)、ニューコール 707-SF(日本乳化剂公司制)、ニューコール 723-SF(日本乳化剂公司制)、ハイテノール N-17(第一工业药品公司制)、サンアミド CF-10(日本油脂公司制)、ミグノール PA-30(一方社公司制)、ニツコール CMT-30(日光化学公司制)、サルコシネート LN-30(日光化学公司制)、アデカプルロニツク TR-704(旭电化公司制)、ユニオール D-700(日本油脂公司制)、プルロニツク 25R-2(旭电化公司制)、ユニループ 50MB-26(日本油脂公司制)。

[0309] ノイゲン TDS-80(第一工业药品公司制)、ノイゲン TDS-120(第一工业药品公司制)、EMALEX OD-16(日本エマルジョン公司制)、ワンダサーフ S-800(青木油脂公司制)、ワンダサーフ S-1400(青木油脂公司制)、ノニオン NS-210(日本油脂公司制)、ノニオン NS-215(日本油脂公司制)、ニューコール 2607(日本乳化剂公司制)、エマルゲン A-60(花王公司制)、BLAUNONDSP-12.5(青木油脂公司制)、ニューポール PE-64(三洋化成公司制)、BLAUNONLPE1007(青木油脂公司制)。

[0310] 实施例 1

[0311] 制备由以下的第一试剂和第二试剂构成的 sdLDL-C 定量用试剂盒。以使用表 1 所示的表面活性剂 A 和表面活性剂 B 的试剂盒作为实施例 1(1) ~ 1(34) 的试剂盒。

[0312] 第一试剂

[0313] MOPS(pH7.0) 20 毫摩尔 /L

[0314] EMSE 0.3g/L

[0315] 硫酸钠 2g/L

[0316] 表面活性剂 A(以下简记为“表 A”)

[0317] LPL3 100kU/L

- [0318] CHO-PEL 1kU/L
- [0319] 过氧化物酶 10kU/L
- [0320] 第二试剂
- [0321] MOPS(pH7.0) 20 毫摩尔 /L
- [0322] 4-氨基安替比林 0.3g/L
- [0323] 过氧化物酶 20kU/L
- [0324] 表面活性剂 B(以下简记为“表B”)
- [0325] 表 1
- [0326]

#	表面活性剂		浓度(g/L)
(1)	表A	バイオニンD-3110	0.01
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(2)	表A	バイオニンD-3110	0.01
	表B	アデカブルロニックTR-704	0.1
		BLAUNON LPE1007	1
(3)	表A	バイオニンD-3120	0.06
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(4)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(5)	表A	ZWITTERGENT 3-10	0.1
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(6)	表A	ニッサンアノンBL	0.3
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(7)	表A	アノンBDF-SF	0.03
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(8)	表A	ビスノールSK	0.005
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(9)	表A	ナイミッドMT-215	0.005
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(10)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3

[0327] 表 1 续 1

[0328]

#		表面活性剂	浓度 (g/L)
(11)	表A	ハイテノールN-17	0.06
	表B	BLAUNON LPE1007 ワンドサーフS-800	1 0.3
(12)	表A	サンアミドCF-10	0.1
	表B	BLAUNON LPE1007 ワンドサーフS-800	1 0.3
(13)	表A	ミグノールPA-30	0.03
	表B	BLAUNON LPE1007 ワンドサーフS-800	1 0.3
(14)	表A	ニッコールCMT-30	0.03
	表B	BLAUNON LPE1007 ワンドサーフS-800	1 0.3
(15)	表A	サルコシネートLN-30	0.06
	表B	BLAUNON LPE1007 ワンドサーフS-800	1 0.3
(16)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	ノイゲンTDS-80	1
(17)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	EMALEX OD-16	1
(18)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	ワンドサーフS-800	1
(19)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	ノニオンNS-210	1
(20)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	ノニオンNS-215	1
(21)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	アクロネセスKP-189R	1
(22)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	ニューコール2607	1
(23)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	ニューポールPE-64	1
(24)	表A	ユニセーフA-LE	0.06
	表B	ブルロニックP-85	1

[0329] 表 1 续 2

[0330]

#	表面活性剂		浓度 (g/L)
(25)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ノイゲンTDS-80	1
(26)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ノイゲンTDS-120	1
(27)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ワンダサーフS-800	1
(28)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ワンダサーフS-1400	1
(29)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ノニオンNS-210	1
(30)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	エマルゲンA-60	1
(31)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ブラウノンDSP-12.5	1
(32)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ニューコール707F	1
(33)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	ブルロニックP-85	1
(34)	表A	ニューコール723-SF	0.1
	表B	BLAUNON LPE1007	1

[0331] 实施例 2

[0332] 根据“新生化学实验讲座4”(东京化学同人)记载的超速离心法,从人血清中分离提取出 HDL(比重为 1.063 以上)、sdLDL(比重为 1.044 ~ 1.063)、LgLDL(比重为 1.006 ~ 1.044)、VLDL 和 CM(比重为 1.006 以下)这 4 种脂蛋白组分,使用实施例 1 的试剂盒,计算出各脂蛋白组分中的胆固醇的反应率。

[0333] (1) 通过各脂蛋白组分中的胆固醇与实施例 1 的试剂盒的反应而进行的各脂蛋白组分的“反应吸光度”的计算

[0334] 使用日立 7170S 型自动分析装置,通过以下操作计算出“反应吸光度”。

[0335] 以各脂蛋白组分为样品添加到反应池 (2 μ L) 中,然后分别添加实施例 1 的试剂盒的第一试剂 (0.15mL),使反应 (第一反应) 开始,在 37℃ 下加热 5 分钟,以主波长 600nm、副波长 700nm 测定反应 5 分钟后反应液的吸光度 (E1)。接着,在该反应液中分别添加实施例 1 (1) ~ 1 (34) 的试剂盒的第二试剂 (0.05mL),再在 37℃ 下加热 5 分钟来进行反应 (第二反应),以主波长 600nm、副波长 700nm 测定第二反应 5 分钟后反应液的吸光度 (E2),从 E2 中减去 E1,计算出吸光度变化 ($\Delta E'$ 脂蛋白组分)。另外,使用生理盐水代替各脂蛋白组分作为样品,进行同样的测定,计算出吸光度变化 ($\Delta E'$ 空白)。最后,根据下述 (式 3) 计算出各脂蛋白组分的“反应吸光度 3”。

[0336] 反应吸光度 3 = $\Delta E'$ 脂蛋白组分 - $\Delta E'$ 空白 (式 3)

[0337] (2) 各脂蛋白组分中的胆固醇的反应率的计算

[0338] 利用日立 7170S 型自动分析装置,并使用总胆固醇定量用试剂盒 デタミナー C

TC(协和梅迪克斯公司制)代替实施例1的试剂盒,除此以外,通过与(1)同样的方法计算出“反应吸光度4”,根据下述(式4),计算出使用实施例1(1)~1(34)各试剂盒时各脂蛋白组分中的胆固醇的反应率(%)。另外,在使用デタミナーC TC的测定中算出的“反应吸光度4”,是指作为对象的脂蛋白中的胆固醇全部反应时的“反应吸光度”。

[0339] 反应率(%) = 反应吸光度3 / 反应吸光度4 × 100 (式4)

[0340] 对于实施例1(1)~1(34)各试剂盒的各脂蛋白组分中的胆固醇的反应率,按照反应率0~10%为“-”、10~20%为“±”、20~50%为“+”、50~80%为“++”、80~100%为“+++”归纳显示于表2。

[0341] 表2

[0342]

试剂盒	脂蛋白组分			
	HDL	s d LDL	L g LDL	VLDL/CM
实施例1(1)	-	++	±	-
实施例1(2)	-	++	-	-
实施例1(3)	-	+++	+	-
实施例1(4)	-	++	±	-
实施例1(5)	-	++	±	-
实施例1(6)	-	+++	+	-
实施例1(7)	-	+++	+	-
实施例1(8)	-	++	±	-
实施例1(9)	-	+++	+	-
实施例1(10)	-	++	±	-
实施例1(11)	-	++	±	-
实施例1(12)	-	++	±	-
实施例1(13)	-	+++	±	-
实施例1(14)	-	++	±	±
实施例1(15)	-	++	±	-
实施例1(16)	-	++	±	-
实施例1(17)	-	++	±	-
实施例1(18)	-	++	±	-
实施例1(19)	-	++	±	-
实施例1(20)	-	++	±	-
实施例1(21)	-	++	±	-
实施例1(22)	-	++	±	-
实施例1(23)	-	++	±	-
实施例1(24)	-	++	±	-
实施例1(25)	-	++	±	-
实施例1(26)	-	++	±	-
实施例1(27)	-	++	±	-
实施例1(28)	-	++	±	-
实施例1(29)	-	++	±	-
实施例1(30)	-	++	±	-
实施例1(31)	-	++	±	-
实施例1(32)	-	++	±	-
实施例1(33)	-	++	±	-
实施例1(34)	-	++	±	-

[0343] 由表2所示可知,实施例1(1)~1(34)所示的试剂盒能够用于sdLDL-C的定量。

[0344] 实施例3

[0345] 制备由以下的第一试剂和第二试剂构成的sdLDL-C定量用试剂盒。以使用表3所

示的表面活性剂 A 和表面活性剂 B 的试剂盒作为实施例 3(35) ~ 3(44) 的试剂盒。

[0346] 第一试剂

[0347] MOPS(pH7.0) 20 毫摩尔 /L

[0348] EMSE 0.3g/L

[0349] 硫酸钠 2g/L

[0350] 表面活性剂 A(以下简记为“表 A”)

[0351] LPL3 100kU/L

[0352] CHO-PEL 1kU/L

[0353] 过氧化物酶 10kU/L

[0354] BSA

[0355] 第二试剂

[0356] MOPS(pH7.0) 20 毫摩尔 /L

[0357] 4-氨基安替比林 0.3g/L

[0358] 过氧化物酶 20kU/L

[0359] 表面活性剂 B(以下简记为“表 B”)

[0360] 表 3

[0361]

#	构成要素		浓度 (g/L)
(35)	表A	ユニセーフA-LE	0.3
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(36)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(37)	表A	ニューコール707-SF	0.5
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(38)	表A	バイオニンD-3110	0.1
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(39)	表A	ナイミーンL-207	0.1
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(40)	表A	ユニセーフA-LE	0.3
	表B	バイオニンD-3120	0.1
		BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3
(41)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	バイオニンD-3120	0.05
		BLAUNON LPE1007	1
		ワンドサーフS-800	0.3

[0362] 表 3 续

[0363]

#	构成要素		浓度 (g/L)
(42)	表A	ユニセーフA-LE	0.5
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンダサーフS-800	0.3
		BSA	3
(43)	表A	ニューコール707-SF	0.3
	表B	BLAUNON LPE1007	1
		ワンダサーフS-800	0.3
		BSA	3
(44)	表A	ニューコール707-SF	0.3
	表B	バイオニンD-3120	0.05
		BLAUNON LPE1007	1
		ワンダサーフS-800	0.3
(45)	表A	ユニオールD-700	7
	表B	ノニオンNS-210	1
		BSA	3
		BSA	3
(46)	表A	ブルロニック25R-2	0.3
	表B	ノニオンNS-210	1
		BSA	3
		BSA	3
(47)	表A	ユニループ50MB-26	20
	表B	ノニオンNS-210	1
		BSA	3
		BSA	3

[0364] 实施例 4

[0365] 使用实施例 3(35) ~ 3(47) 的试剂盒, 与实施例 2 的 (1) 记载的测定方法同样地操作, 利用日立 7170S 型自动分析装置, 分别测定人血清 24 个样品的反应吸光度。

[0366] 接着, 使用该血清, 通过 Journal of Lipid Research vol. 44, p. 2193-2201 (2003) 记载的超速离心法离心分离出该样品中的 sdLDL, 使用 デタミナー L TCII (协和梅迪克斯公司制) 测定所得到的 sdLDL 组分中的胆固醇量。将使用实施例 3(35) ~ 3(47) 的试剂盒进行的测定中的测定值与通过超速离心法得到的测定值的相关系数记于表 4。

[0367] 表 4

[0368]

试剂盒	对超速离心法的相关系数
实施例 3(35)	0.871
实施例 3(36)	0.888
实施例 3(37)	0.912
实施例 3(38)	0.864
实施例 3(39)	0.890
实施例 3(40)	0.902
实施例 3(41)	0.915
实施例 3(42)	0.919
实施例 3(43)	0.916

实施例 3(44)	0.927
实施例 3(45)	0.886
实施例 3(46)	0.876
实施例 3(47)	0.856

[0369] 由表 4 所示可知,使用实施例 3(35) ~ 3(44) 的试剂盒得到的测定结果,与通过超速离心法得到的测定结果显示出良好的相关。

[0370] 另外,由使用第一试剂中含有 BSA 的实施例 3(42) 和 3(43) 的试剂盒的测定、与使用实施例 3(35) 和 3(37) 的试剂盒的测定之间的比较,可以判断:通过使用第一试剂中含有 BSA 的试剂盒,比使用第一试剂中不含有 BSA 的试剂盒时与超速离心法之间的相关更好。

[0371] 实施例 5

[0372] 制备由以下的第一试剂和第二试剂构成的 sdLDL-C 定量用试剂盒。以使用表 5 所示的表面活性剂 A 和表面活性剂 B 的试剂盒作为实施例 5(48) ~ 5(57) 的试剂盒。

[0373] 第一试剂

[0374] MOPS (pH7.0) 20 毫摩尔 /L

[0375] EMSE 0.3g/L

[0376] 硫酸钠 2g/L

[0377] 过氧化物酶 10kU/L

[0378] BSA 3g/L

[0379] 表面活性剂 A (以下简记为“表 A”)

[0380] 胆固醇酯水解酶 (以下简记为“CHER”)

[0381] 胆固醇氧化酶 (以下简记为“CHOD”)

[0382] 第二试剂

[0383] MOPS (pH7.0) 20 毫摩尔 /L

[0384] 4-氨基安替比林 0.3g/L

[0385] 过氧化物酶 20kU/L

[0386] BLAUNON LPE-1007 1g/L

[0387] ワンダサーフ S-800 0.3g/L

[0388] 表 5

[0389]

#	构成要素		浓度
(48)	表A	ニューコール707-SF	0.5 g/L
	CHER	LP	300 kU/L
	CHOD	CHO-PEL	1 kU/L
(49)	表A	ニューコール707-SF	0.5 g/L
	CHER	LPAP	200 kU/L
	CHOD	CHO-PEL	1 kU/L
(50)	表A	ニューコール707-SF	0.2 g/L
	CHER	LIPS	400 kU/L
	CHOD	CHO-PEL	1 kU/L
(51)	表A	ニューコール707-SF	0.5 g/L
	CHER	LPL3	300 kU/L
	CHOD	CHO-CE	1 kU/L
(52)	表A	ニューコール707-SF	0.7 g/L
	CHER	LP	300 kU/L
	CHOD	CHO-CE	1 kU/L
(53)	表A	ニューコール707-SF	0.7 g/L
	CHER	LPL3	300 kU/L
	CHOD	COO-322	1 kU/L
(54)	表A	ニューコール707-SF	0.7 g/L
	CHER	LP	300 kU/L
	CHOD	COO-322	1 kU/L
(55)	表A	ニューコール707-SF	0.7 g/L
		ユニオールD-700	7 g/L
	CHER	LP	300 kU/L
(56)	表A	ニューコール707-SF	0.7 g/L
		ブルロニック25R-2	0.7 g/L
	CHER	LP	300 kU/L
(57)	表A	ニューコール707-SF	0.7 g/L
		ユニループ50MB-26	10 g/L
	CHOD	COO-322	1 kU/L

[0390] 实施例 6

[0391] 使用实施例 3(43) 和实施例 5(48) ~ 5(57) 的试剂盒, 与实施例 2 的 (1) 记载的测定方法同样地操作, 利用日立 7170S 型自动分析装置, 分别测定人血清 25 个样品的反应吸光度。

[0392] 接着, 使用该血清, 通过 Journal of Lipid Research vol. 44, p. 2193-2201 (2003) 记载的超速离心法离心分离出该样品中的 sdLDL, 使用 デタミナー L TCII (协和梅迪克斯公司制) 测定所得到的 sdLDL 组分中的胆固醇量。将使用实施例 3(43) 和实施例 5(48) ~ 5(57) 的试剂盒进行的测定中的测定值与通过超速离心法得到的测定值的相关系数记于表 6。

[0393] 表 6

[0394]

试剂盒	对超速离心法的相关系数
实施例 3(43)	0.914
实施例 5(48)	0.949
实施例 5(49)	0.914
实施例 5(50)	0.887
实施例 5(51)	0.935
实施例 5(52)	0.969
实施例 5(53)	0.928
实施例 5(54)	0.880
实施例 5(55)	0.918
实施例 5(56)	0.924
实施例 5(57)	0.897

[0395] 由表 6 所示可知,使用实施例 3(43) 和实施例 5(48) ~ 5(57) 的试剂盒得到的测定结果,与通过超速离心法得到的测定结果显示出良好的相关。

[0396] 实施例 7

[0397] 制备由以下的第一试剂和第二试剂构成的 sdLDL-C 定量用试剂盒。以使用表 7 所示的表面活性剂 A 和表面活性剂 B 的试剂盒作为实施例 7(58) ~ 7(67) 的试剂盒。

[0398] 第一试剂

[0399] MOPS (pH7.0) 20 毫摩尔 /L

[0400] EMSE 0.3g/L

[0401] 硫酸钠 2g/L

[0402] 表面活性剂 A (以下简记为“表 A”)

[0403] LPL3 100kU/L

[0404] CHO-PEL 1kU/L

[0405] 过氧化物酶 10kU/L

[0406] BSA

[0407] 第二试剂

[0408] MOPS (pH7.0) 20 毫摩尔 /L

[0409] 4-氨基安替比林 0.3g/L

[0410] 过氧化物酶 20kU/L

[0411] 表面活性剂 B (以下简记为“表 B”)

[0412] 表 7

[0413]

#	構成要素		濃度 (g/L)
(58)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	ノイゲンTDS-80	1
(59)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	ノイゲンTDS-120	1
(60)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	EMALEX OD-16	1
(61)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	ノニオンNS-210	1
(62)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	ワンダサーフS-800	1
(63)	表A	アデカブルロニックTR-704	1
	表B	エマルゲンA-60	1
(64)	表A	ニューコール707-SF	0.3
	表B	ノイゲンTDS-80	1
	BSA		3
(65)	表A	ニューコール707-SF	0.3
	表B	ノイゲンTDS-120	1
	BSA		3
(66)	表A	ニューコール707-SF	0.3
	表B	ノニオンNS-210	1
	BSA		3
(67)	表A	ニューコール707-SF	0.3
	表B	エマルゲンA-60	1
	BSA		3

[0414] 実施例 8

[0415] 使用実施例 3(36) 和实施例 7(58) ~ 7(67) の试剂盒, 与实施例 2 的 (1) 记载的测定方法同样地操作, 分别测定人血清 21 个样品的反应吸光度。

[0416] 接着, 使用该血清, 通过 Journal of Lipid Research vol. 44, p. 2193-2201 (2003) 记载的超速离心法离心分离出该血清中的 sdLDL, 使用デタミナー L TCII (协和梅迪克斯公司制) 测定所得到的 sdLDL 组分中的胆固醇量。将使用各实施例和比较例的试剂盒进行的测定中的测定值与通过超速离心法得到的测定值的相关系数记于表 8。

[0417] 表 8

[0418]

试剂盒	对超速离心法的相关系数
实施例 3(36)	0.889
实施例 7(58)	0.925
实施例 7(59)	0.879
实施例 7(60)	0.922
实施例 7(61)	0.915
实施例 7(62)	0.908
实施例 7(63)	0.890
实施例 7(64)	0.933
实施例 7(65)	0.931

实施例 7(66)	0.914
实施例 7(67)	0.932

[0419] 由表 8 所示可知,使用实施例 3(36) 和实施例 7(58) ~ 7(67) 的试剂盒得到的测定结果,与通过超速离心法得到的测定结果显示出良好的相关。

[0420] 实施例 9

[0421] 样品中的 sdLDL-C 的定量

[0422] 使用超速离心法及本发明的实施例 3(36) 和实施例 3(44) 的试剂盒,针对人新鲜血清 2 个样品,通过以下方法对各样品中的 sdLDL-C 进行定量。

[0423] (1) 使用超速离心法进行的人血清样品中 sdLDL-C 的定量

[0424] 使用该人血清 2 样品,通过 Journal of Lipid Research vol.44, p. 2193-2201 (2003) 记载的超速离心法离心分离出该血清中的 sdLDL,使用 デタミナー L TCII (协和梅迪克斯公司制) 测定所得到的 sdLDL 组分中的胆固醇量。

[0425] (2) 标准曲线的制作

[0426] 以通过超速离心法的测定判断 sdLDL-C 浓度为 43.1mg/dL 的血清标准液作为标准曲线制作用样品。与实施例 2 的 (1) 记载的测定方法同样地操作,利用日立 7170S 自动分析装置,使用实施例 3(36) 和实施例 3(44) 的试剂盒,测定标准曲线制作用样品的反应吸光度,由该反应吸光度与标准曲线制作用样品中的 sdLDL-C 浓度的关系制作各试剂盒的标准曲线。

[0427] (3) 人血清 2 个样品中的 sdLDL-C 的定量

[0428] 使用人血清 2 个样品代替标准曲线制作用样品,通过与上述 (2) 同样的方法,对该 2 个样品分别进行反应,针对各试剂盒,由反应后反应液的吸光度与上述 (2) 中制作的标准曲线,确定各样品中的 sdLDL-C 浓度。

[0429] 对于该 2 个样品,将上述 (1) 的通过超速离心法确定的该样品中的 sdLDL-C 浓度、与上述 (3) 的通过使用实施例 3(36) 和实施例 3(44) 的试剂盒进行的测定而确定的该样品中的 sdLDL-C 浓度示于表 9。

[0430] 表 9

[0431]

	sdLDL-C 浓度(mg/dL)		
	超速离心法	实施例 3(36)	实施例 3(44)
血清 1	88.2	87.3	85.8
血清 2	31.9	31.7	29.5

[0432] 表 9 显示出,使用本发明的试剂盒,通过本发明的方法,能够对人血清中的 sdLDL-C 准确地进行定量。

[0433] 工业上利用的可能性

[0434] 根据本发明,能够提供在动脉硬化等冠状动脉疾病的诊断中有用的小而密低密度脂蛋白中的胆固醇的定量方法及定量用试剂盒。