



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102928604 A

(43) 申请公布日 2013.02.13

(21) 申请号 201210284489.0

(22) 申请日 2012.08.08

(30) 优先权数据

2011-173106 2011.08.08 JP

(71) 申请人 爱科来株式会社

地址 日本京都府

(72) 发明人 富樫智子 八木雅之

(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 肖善强

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

羧甲基精氨酸的免疫测定方法

(57) 摘要

本发明提供了羧甲基精氨酸的免疫测定方法,其是羧甲基精氨酸的新的测定方法,所述方法可以简便地以良好精度测定羧甲基精氨酸。其是一种测定试样中的羧甲基精氨酸的方法,包括:用含有尿素的预处理剂处理试样,以及通过免疫学方法测定经预处理的试样中的羧甲基精氨酸。

1. 一种羧甲基精氨酸的测定方法,所述方法是测定试样中的羧甲基精氨酸的方法,所述方法包括:

用含有尿素的预处理剂处理所述试样,以及

通过免疫学方法测定经所述处理的试样中的羧甲基精氨酸。

2. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述预处理剂含有尿素作为有效成分。

3. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述试样是生物体试样。

4. 根据权利要求3所述的测定方法,其中所述生物体试样是来自尿、来自血液或者来自组织的。

5. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述免疫学方法选自酶联免疫检验法、免疫层析法及凝集法构成的组。

6. 根据权利要求1至5中任意一项所述的测定方法,其中通过所述免疫学方法进行的测定包括:将经所述处理的试样与抗体致敏粒子混合,以及测定所述抗体致敏粒子的凝集,其中所述抗体致敏粒子被与羧甲基精氨酸反应的抗体致敏。

7. 根据权利要求6所述的测定方法,其中所述抗体致敏粒子是通过以抗体致敏不溶性载体粒子而得到的抗体致敏粒子。

8. 根据权利要求7所述的测定方法,其中所述不溶性载体粒子选自自由乳胶粒子及胶体金粒子构成的组。

9. 一种用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的试样的预处理剂,所述预处理剂含有尿素。

10. 根据权利要求9所述的预处理剂,其含有有效量的尿素作为有效成分。

11. 一种用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的测定用试剂盒,所述试剂盒含有:含有尿素的预处理剂、和

用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的测定用试剂。

12. 根据权利要求11所述的测定用试剂盒,其中所述测定用试剂含有抗体致敏粒子。

13. 根据权利要求12所述的测定用试剂盒,其中所述抗体致敏粒子是通过以抗体致敏不溶性载体粒子而得到的抗体致敏粒子。

14. 根据权利要求13所述的测定用试剂盒,其中所述不溶性载体粒子选自自由乳胶粒子及胶体金粒子构成的组。

15. 尿素用于制造用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的试样的预处理剂的用途。

羧甲基精氨酸的免疫测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及羧甲基精氨酸的免疫测定方法。

背景技术

[0002] AGEs(晚期糖化终末产物, Advanced Glycation end-products) 是美拉德反应的后期反应中生成的物质, 其与老化、多种疾病的发病 / 进展的相关性正日益清楚。例如, 已知: 皮肤中 AGEs 生成、积蓄后, 成为皮肤弹性降低、皱纹、松弛及色斑等的原因之一。

[0003] N^ω-羧甲基精氨酸(下文中也称为“CMA”)作为 AGEs 中的一种被人所知。已确认 CMA 是胶原中特异性生成的 AGEs(例如, 日本特许 3889190 号)。因此, 提出了下述 CMA 生成抑制剂, 所述抑制剂的目的是通过抑制生物体中 CMA 的生成来防止由 CMA 的生成和向胶原的积蓄而导致的老化 / 疾病(WO2011/004734)。此外, 因为糖尿病患者的血清蛋白质中的 CMA 水平较之同年龄段的健康人的血清蛋白质的 CMA 水平显著更高, 所以期待 CMA 作为糖尿病中糖化的新诊断标志物的可能性(Odani et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 285, 1232-1236(2001))。此外, 还期待 CMA 作为骨质疏松症的标志物的利用可能性。

[0004] 从 CMA 被发现以前开始, 戊糖素(pentosidine)、羧甲基赖氨酸(下文中称为“CML”)、吡咯素(pyrraline) 等的数百种的物质被鉴定为 AGEs, 并尝试将它们作为抗糖化标志物利用。但是, 因为戊糖素、CML 并非组织特异性的, 因此即使测定它们的血中浓度, 也无法确定发生糖化的组织。另一方面, 如上文所述, 因为 CMA 对胶原等结缔组织蛋白质来说是特异性的, 因此测定 CMA 得到的值可作为结缔组织蛋白质(特别是胶原)中糖化的指标。因此, 提出了特异性识别 CMA 的抗体及含有所述抗体的用于检测 CMA 的免疫试剂。

发明内容

[0005] 本发明涉及对试样中羧甲基精氨酸的测定方法, 所述方法包括: 用含有尿素的预处理剂处理试样, 以及根据免疫学方法测定前述经处理的试样中的羧甲基精氨酸。

附图说明

[0006] 图 1 是示出实施例 1 的结果的一个例子的图;

[0007] 图 2 是示出比较例 1 的结果的一个例子的图;

[0008] 图 3 是示出从实施例 1 和比较例 1 的结果得到的校正线的一个例子的图。

具体实施方式

[0009] 使用日本特开 2002-243732 号公报中公开的抗体等测定试剂, 针对含有 CMA 标准品的样品, 通过免疫学方法, 进行 CMA 测定, 获得了很好的灵敏度。但是, 本发明的发明人们发现了新的问题——在生物体试样(特别是来自血液的试样)的情况下, 即使使用上述测定试剂, CMA 也基本不被检出。另一方面, 作为测定生物体试样中的 CMA 的其它方法, 例如

有 LC/MS 法等,但是该方法中存在下述问题:该方法需要特殊的装置,测定极其复杂。因此,本发明提供了新的 CMA 测定方法,所述方法能简便地、以良好精度测定 CMA。

[0010] 在一种或多种实施方式中,本发明涉及下述试样中的羧甲基精氨酸的测定方法(下文中也称为“本发明的测定方法”),所述方法包括:用含有尿素的预处理剂处理试样,以及通过免疫学方法,对前述经处理的试样中的羧甲基精氨酸加以测定。

[0011] 通过本发明,例如,能够简单且以良好精度测定如生物体试样等的试样中的 CMA。

[0012] 本发明基于下述发现:通过尿素($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)对生物体试样进行预处理之后,通过免疫学方法测定 CMA,能够简单且以良好精度测定生物体试样中的 CMA。

[0013] 通过用尿素对生物体试样进行预处理、能用免疫学方法测定生物体试样中的 CMA 的详细机制尚不清楚,但推定为如下。即,认为生物体试样(特别是血液试样)中的 CMA 是以与清蛋白等蛋白质结合的状态存在的。因此,认为即使添加特异性识别 CMA 的抗体,因为 CMA 基本不能与抗体结合所以基本不被检出,而通过用尿素进行预处理,由于与 CMA 结合的蛋白质发生了结构变化,或者不再保持 CMA 与蛋白质的结合等原因,CMA 和抗体的反应性提高。但是,本发明不限于通过这些机制进行解释。

[0014] 通过本发明的测定方法,能简单且以良好精度知晓生物体内生成和/或积蓄的 CMA 的量。正尝试将 CMA 例如作为抗糖化标志物、皮肤老化标志物和/或骨质疏松症标志物利用。因此,通过本发明的测定方法,能知晓糖化胁迫(glycation stress)、皮肤老化和/或骨质疏松症的症状程度、发病可能性,在对它们的预防、抗衰老的领域中有用。此外,还已知 CMA 在胶原中特异性生成和/或积蓄。因此,基于根据本发明的 CMA 测定方法得到的 CMA 测定值,能获得下述效果:例如,能监测胶原的老化度、皮肤的老化度,能从该结果来进行对人的老化度的评价。

[0015] 在本发明测定方法的一种或多种实施方式中,对于试样而言,从通过预处理剂容易获得测定灵敏度提高的效果的角度来看,生物体试样是优选的。作为生物体试样,例如可以是来自尿、来自血液或者来自组织的试样。作为来自血液的试样,例如可以是全血试样、血清试样、血浆试样及溶血试样等。作为来自组织的试样,可以是来自生物体的组织制备的试样。作为组织,例如可以是含有胶原的组织。作为含有胶原的组织,例如可以是骨、皮肤及腱等。作为试样,其中,来自血液的试样是优选的,因为通过用预处理剂处理容易进一步得到测定灵敏度提高的效果。此外,在所述来自血液的试样中,血清试样和血浆试样是进一步优选的。对试样而言,可以以采自生物体的原样使用,也可以稀释之后使用。此外,通过本发明的测定方法,即使试样中含有的 CMA 不是经分离和/或精制的 CMA(CMA 标准品),也可以简单且以良好精度进行测定。

[0016] 本发明测定方法的一种或多种实施方式中,预处理剂可以含有有效量的尿素作为有效成分,例如,实质上由尿素构成的预处理剂也是可以的。本说明书中,“实质上由尿素构成”表示除了预处理剂的原料中含有的不可避免的杂质和/或预处理剂的制造过程中混入的不可避免的杂质之外由尿素构成。

[0017] 通过含有尿素的预处理剂对试样的处理,例如,可通过使含有尿素的预处理剂与试样在溶液中共存来进行。通过使尿素和试样共存,试样中的 CMA 和抗体的反应性提高、测定灵敏度提高。对使得预处理剂和试样在溶液中共存的方法及其顺序并无特别限制,例如,可以向试样中添加预处理剂,也可以向含有预处理剂的溶液中添加试样。

[0018] 通过预处理剂处理试样的步骤中,对处理试样时的尿素浓度(含有预处理剂和试样的预处理溶液中的浓度)没有被特别限定,例如是 0.01M ~ 10M,优选为 0.01M ~ 8M。预处理溶液的 pH 没有被特别限定,例如是 4.0 ~ 9.0,优选为 5.0 ~ 8.0,更优选为 6.0 ~ 7.5。

[0019] 使用预处理剂的处理温度没有被特别限定,例如是 0 ~ 60℃,处理之后接着立即实施免疫学测定的情况下,4 ~ 45℃是优选的,更优选为 25 ~ 37℃。使用预处理剂的处理时间没有被特别限定,例如是 0.1 分钟 ~ 12 小时,就测定上的简便性而言,0.1 ~ 30 分钟是优选的,更优选为 0.1 ~ 10 分钟。

[0020] 本说明书中,“免疫学方法”可以是使用对 CMA 有特异性的抗体、其片段或其类似物来检测或测定 CMA 的方法,例如但不限于,EIA(酶联免疫检验)法、免疫层析法(immunochromatography)及凝集法(agglutination)等。可以根据试样的种类来合适地决定免疫学方法,当试样是来自血液的试样的情况下,就提高测定精度而言,凝集法是优选的。此外,可以根据试样中 CMA 的状态来合适地决定免疫学方法。在大分子中 CMA 以多个分子存在的情况下,非竞争法是优选的,在 CMA 以一个分子单独存在的情况下,竞争法是优选的。

[0021] 通过免疫学方法的测定例如可以利用试样中的 CMA 和与 CMA 特异性反应的抗体(下文中也称为“抗 CMA 抗体”)之间的抗原抗体反应来进行。下文中,以凝集法为例,对通过免疫学方法的测定进行说明。作为凝集法,可采用非竞争性方法和竞争性方法。在通过非竞争性方法进行测定的情况下,没有特别限定,例如,可通过将致敏了抗 CMA 抗体的粒子(下文中称为“抗体致敏粒子”)和上文所述进行了预处理的试样进行混合、以及测定抗体致敏粒子的凝集,来测定试样中的 CMA。

[0022] 抗 CMA 抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。作为抗 CMA 抗体,例如可以是日本特开 2002-243732 号公报等中公开的。可以使用市售的抗 CMA 抗体,也可以使用自行制备的抗 CMA 抗体。致敏抗体的粒子没有被特别限制,可以使用通常可用于免疫学方法中的公知粒子,例如,不溶性载体粒子及磁性粒子等。不溶性载体粒子没有被特别限定,例如可以是聚苯乙烯乳胶粒子等的乳胶粒子、聚丙烯粒子、聚乙烯粒子、明胶粒子、胶体金粒子等,其中乳胶粒子是优选的。粒子的粒径没有被特别限定,在乳胶粒子的情况下,例如是 0.05 ~ 1.0 μm,就容易维持分散性、测定凝集度的方面而言,0.10 ~ 0.50 μm 是优选的。通过抗 CMA 抗体来致敏粒子的方法没有被特别限制,可按照该领域公知的方法进行,例如可以是物理吸附法和化学结合法。抗体致敏粒子例如可悬浮于水或缓冲液中作为悬浮液来使用。悬浮液中粒子的比例没有被特别限定,例如是 0.01 ~ 1 重量%。作为用于缓冲液的缓冲剂,例如可以是 Good's 缓冲剂、磷酸缓冲剂及 Tris 缓冲剂等。

[0023] 预处理后的试样与抗体致敏粒子的反应温度没有被特别限定,例如优选是 4 ~ 45℃,更优选为 25 ~ 37℃。反应时间没有被特别限定,例如是 0.1 ~ 60 分钟,就测定的迅速性和测定灵敏度提高的方面考虑,1 ~ 30 分钟是优选的,更优选为 3 ~ 15 分钟。抗体致敏粒子和试样的混合液中抗体致敏粒子的浓度没有被特别限制,例如是 0.001 ~ 0.2w/v%,0.02 ~ 0.07w/v%是优选的。凝集的测定没有被特别限制,例如可使用分光光度计、光学测定装置等、通过测定吸光度和 / 或浑浊度来进行。

[0024] 通过竞争性的方法进行测定的情况下,没有特别限定,例如,可通过将上述进行了预处理的试样与 CMA 承载物质混合、将与 CMA 承载物质混合的试样与抗体致敏粒子混合、

以及测定抗体致敏粒子的凝集,来测定试样中的 CMA。作为 CMA 承载物质,例如可以是使 CMA(抗原)致敏的粒子、将 CMA 结合至血蓝蛋白及清蛋白的载体物质的物质、糖化胶原等。糖化胶原可以是经糖化的胶原,例如能通过使胶原与葡萄糖在中性磷酸缓冲液中共存、于 37 度孵育来制备。糖化胶原的制备方法例如被公开于日本特开 2002-243732 号公报中。

[0025] 预处理后的试样和 CMA 承载物质的反应温度没有被特别限定,例如优选是 4 ~ 45°C,更优选为 25 ~ 37°C。反应时间没有被特别限定,例如是 0 ~ 60 分钟,就测定的迅速性和确保溶液的均一性的方面考虑,0.5 ~ 10 分钟是优选的,更优选为 0.5 ~ 5 分钟。试样和 CMA 承载物质的混合液中 CMA 承载物质的浓度没有被特别限制,例如是 0.001 ~ 0.2w/v%,0.001 ~ 0.05w/v%是优选的。与抗体致敏粒子的反应温度及反应时间、以及抗体致敏粒子的混合液中的浓度与上文所述的非竞争法相同。

[0026] 在一种或多种实施方式中,本发明的测定方法也可包括:基于通过免疫学方法测定得到的结果,对试样中的 CMA 进行定量。通过对试样中的 CMA 进行定量,能知晓糖化胁迫、皮肤老化和 / 或骨质疏松症的症状程度、发病可能性,还能判定和 / 或监测胶原的老化度和 / 或皮肤的老化度。

[0027] 因此,作为其它形式,本发明可以涉及对糖化胁迫、骨质疏松症、胶原的老化度或皮肤的老化度的判定方法,所述方法包括:用含有尿素的预处理剂处理试样,通过免疫学方法对经预处理的试样中的 CMA 加以测定,以及基于通过免疫学方法得到的测定结果对试样中的 CMA 加以定量。

[0028] (试样的预处理方法)

[0029] 作为本发明的又一其它形式,本发明涉及为通过免疫学方法对试样中的 CMA 进行测定而对试样进行预处理的方法,所述方法包括用含有尿素的预处理剂处理试样。通过根据本发明的预处理方法进行对试样的预处理,例如可使用高精度的免疫学方法对试样中的 CMA 进行测定。预处理剂的处理条件可以按照与上文所述的 CMA 测定方法相同地进行。

[0030] (预处理剂)

[0031] 作为本发明又一其它形式,本发明涉及为通过免疫学方法对 CMA 进行测定的试样的预处理剂,所述预处理剂含有尿素。使用本发明的预处理剂,可以简便地对试样预处理,以通过免疫学方法来测定试样中的 CMA。

[0032] 预处理剂可含有有效量的尿素作为有效成分,例如,实质上由尿素构成的预处理剂也是可以的。

[0033] 预处理剂的形态没有被特别限制,可以是液体体系(液态试剂),也可以是干燥体系,从便利性的方面考虑,溶解于水或缓冲液中的液态试剂是优选的。液体体系的情况下,预处理剂中的尿素浓度没有被特别限定,例如是 0.01M ~ 10M,优选为 0.01M ~ 8M。

[0034] (通过免疫学方法的 CMA 测定用试剂盒)

[0035] 作为本发明又一其它形式,本发明涉及用于通过免疫学方法测定 CMA 的测定用试剂盒,所述试剂盒含有:含有尿素的预处理剂、以及用于通过免疫学方法测定 CMA 的测定用试剂。通过本发明的测定试剂盒,可以简便地通过免疫学方法测定 CMA。作为预处理剂,可以是上文所述的预处理剂。

[0036] 测定用试剂没有特别限制,只要含有可使用对 CMA 特异性的抗体、其片段或其类似物来检出或测定 CMA 的试剂,可以根据进行测定的免疫学方法来合适地确定试剂的构

成。其中,优选地,测定用试剂盒含有抗 CMA 抗体致敏粒子。关于抗 CMA 抗体致敏粒子,可使用上文所述的 CMA 测定方法中公开的那些。

[0037] 本发明的测定用试剂盒还可含有:例如,用于稀释试样的试样制备液。作为试样制备液,没有特别限制,例如可以是水和缓冲液。

[0038] 优选地,本发明的测定用试剂盒含有操作说明书,所述说明书记载了使用上述试剂通过免疫学方法测定试样中的 CMA 的方法。本发明的测定用试剂盒也可含有下述情况:操作说明书不和本发明的测定试剂盒一同包装,而是在网络上提供。

[0039] 作为本发明的测定用试剂盒,例如,预处理剂及测定用试剂也可被收纳于试剂包装中。试剂包装例如优选为可用后即弃的药筒形状,备有两种以上的、可放置上述试剂的槽是更优选的。作为本发明的测定用试剂盒,预处理剂及测定用试剂中的各种被分别放置于各自的槽中的试剂包装是优选的。试剂包装没有被特别限制,例如,还可含有反应槽、检查物槽、分配管尖(dispensation chip)、反应用光学盒及可废弃槽等。通过使用这样的试剂包装,例如,能更简便地实施本发明的测定方法,此外,还能极其容易地适用于自动化装置。

[0040] (预处理用试剂盒)

[0041] 作为本发明又一其它形式,本发明涉及用于通过免疫学方法测定试样中的 CMA 的试样预处理用试剂盒,所述试剂盒含有:含有尿素的预处理剂。使用本发明的预处理用试剂盒,可简便地进行本发明的预处理方法。本发明的预处理用试剂盒优选还含有例如用于稀释试样的试样制备液和/或记载了使用上述预处理剂的预处理剂方法的操作说明书。

[0042] 本发明还可涉及以下一种或多种实施方式;

[0043] [1] 一种羧甲基精氨酸的测定方法,所述方法是测定试样中的羧甲基精氨酸的方法,其包括:用含有尿素的预处理剂处理所述试样,以及通过免疫学方法测定经所述处理的试样中的羧甲基精氨酸;

[0044] [2] 根据 [1] 所述的测定方法,其中所述预处理剂含有尿素作为有效成分;

[0045] [3] 根据 [1] 或 [2] 所述的测定方法,其中所述试样是生物体试样;

[0046] [4] 根据 [3] 所述的测定方法,其中所述生物体试样是来自尿、来自血液或者来自组织的;

[0047] [5] 根据 [1] 至 [4] 中任意一项所述的测定方法,其中所述免疫学方法选自自由酶联免疫检验法、免疫层析法及凝集法构成的组;

[0048] [6] 根据 [1] 至 [5] 中任意一项所述的测定方法,其中通过所述免疫学方法进行的测定包括:将经所述处理的试样与抗体致敏粒子混合,以及测定所述抗体致敏粒子的凝集,其中所述抗体致敏粒子被与羧甲基精氨酸反应的抗体致敏;

[0049] [7] 根据 [6] 所述的测定方法,其中所述抗体致敏粒子是使不溶性载体粒子致敏抗体的抗体致敏粒子;

[0050] [8] 根据 [7] 所述的测定方法,其中所述不溶性载体粒子选自自由乳胶粒子及胶体金粒子构成的组;

[0051] [9] 一种用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的试样的预处理剂,所述预处理剂含有尿素;

[0052] [10] 根据 [9] 所述的预处理剂,其含有有效量的尿素作为有效成分;

[0053] [11] 一种用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的测定用试剂盒,所述试剂盒含

有：含有尿素的预处理剂、和用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的测定用试剂；

[0054] [12] 根据 [11] 所述的测定用试剂盒，其中所述测定用试剂含有抗体致敏粒子；

[0055] [13] 根据 [12] 所述的测定用试剂盒，其中所述抗体致敏粒子是使不溶性载体粒子致敏抗体的抗体致敏粒子；

[0056] [14] 根据 [13] 所述的测定用试剂盒，其中所述不溶性载体粒子选自自由乳胶粒子及胶体金粒子构成的组；

[0057] [15] 根据 [11] 至 [14] 中任意一项记载的测定用试剂盒，用于进行 [1] 至 [8] 中任意一项所述的测定方法；

[0058] [16] 尿素用于制造用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的试样的预处理剂的用途；

[0059] [17] 尿素作为用于通过免疫学方法测定羧甲基精氨酸的试样的预处理剂的用途；

[0060] [18] 用于通过免疫学方法测定试样中的羧甲基精氨酸的试样预处理方法，所述预处理方法包括用含有尿素的预处理剂处理试样。

[0061] 下文中使用实施例和比较例来进一步说明本发明。但是本发明并不限于用以下实施例来解释。

[0062] 【实施例】

[0063] [抗 CMA 多克隆抗体致敏乳胶粒子的制备]

[0064] 抗 CMA 多克隆抗体致敏乳胶粒子是用下述方法制备的。首先，向 10mM HEPES-NaOH(pH7.7) 中添加乳胶粒子，达到 0.5w/V%，向 1mL 该乳胶粒子分散液中添加 0.3mL 的 1mg/mL WSC 水溶液，于 25℃ 进行 15 分钟颠倒混合。再添加 0.5mL 含有 1mg/mL 抗 CMA 抗体的 PBS，于 25℃ 进行 60 分钟颠倒混合。再添加 454 μ L 的、含有 10w/V% BSA 的 10mM HEPES-NaOH(pH7.7)，使乳胶粒子悬浮后，于 25℃ 进行 60 分钟颠倒混合。接下来，于 10℃ 以 15,000rpm 进行 30 分钟离心分离，除去上清液。向得到的残渣中添加 3mL 的、10mM HEPES-NaOH(pH7.7) (含有 0.1% Tween20、0.1% BSA)，使乳胶粒子悬浮后，再于 10℃ 以 15,000rpm 进行 30 分钟离心分离，除去上清液。向得到的残余物中添加 2.5mL 的 20mM MOPS-NaOH(pH7.5) (含有 5% 甘油、0.05% BSA、0.05% 叠氮化钠)，使乳胶粒子悬浮，制备了抗 CMA 多克隆抗体致敏乳胶粒子。

[0065] (实施例 1)

[0066] [预处理步骤]

[0067] 通过将血清和等量的 7M 尿素水溶液混合、于 25℃ 进行 30 分钟的孵育，进行了试样预处理。并且，使得预处理溶液的 pH 为 7。

[0068] [免疫测定步骤]

[0069] 将 20 μ L 经预处理的试样与 115 μ L 下文所述的第一试剂混合，于 37℃ 进行 5 分钟的孵育。接着，添加 115 μ L 的第二试剂，测定 660nm 的吸光度，得到初始值。再在 37℃ 孵育 5 分钟之后，测定 660nm 的吸光度，获得得到的测定值与初始值的差 (Δ 吸光度)。此外，用蒸馏水对经预处理的试样进行 2、4 或 8 倍稀释，用它们进行与上文所述相同的测定。其结果示于图 1。图 1 中，纵轴表示 Δ 吸光度，横轴表示测定时间，1 个点意味着 19.92 秒。另外，测定是用日立公司生产的自动分析装置 7070 来进行的。

[0070] < 第一试剂 >

[0071] 1% PEG20000

[0072] 1% BSA

[0073] 0.9% NaCl

[0074] 0.1% EDTA₂Na

[0075] 0.09% NaN₃

[0076] 0.2M Tris-HCl 缓冲液

[0077] pH8.4

[0078] < 第二试剂 >

[0079] 0.05% 抗 CMA 多克隆抗体致敏乳胶粒子 (直径 :370nm, 白色)

[0080] 5% 甘油

[0081] 0.05% BSA

[0082] 0.05% NaN₃

[0083] 20mM MOPS

[0084] pH7.5

[0085] (比较例 1)

[0086] 作为比较例,将血清和等量的蒸馏水混合,除了不进行预处理之外,进行与实施例 1 相同的测定。其结果示于图 2。

[0087] 基于图 1 和图 2 的结果,针对实施例 1 和比较例 1 绘制标准线。其结果示于图 3。图 3 中,纵轴表示 Δ 吸光度,横轴表示试样(血清)的稀释倍率。如图 1 ~ 3 所示,与没有进行预处理的试样相比,用尿素进行了预处理的试样的反应性大幅提高。另外,通过用尿素进行试样预处理, Δ 吸光度以浓度依赖性方式升高。因此确认了通过本发明的测定方法,可以通过免疫学方法测定生物体试样中的 CMA 浓度。

[0088] 本发明的试样分析方法可用于例如医疗领域、临床检查领域等多种多样的领域。显然,本领域技术人员可以理解:本发明的测定方法既可以用于诊断或医疗目的,也可以用于非诊断目的(例如用于基础科学研究等)。

[0089] 在不脱离其宗旨的范围内,本发明可以作为上文所述以外的形态来实施。本申请中公开的实施方式仅作为例子,并非限定于这些。关于对本发明的范围的解释,所附权利要求的范围内记载优先于上文说明书的记载,在与权利要求范围等同的范围内的全部变更也包含在权利要求的范围内。

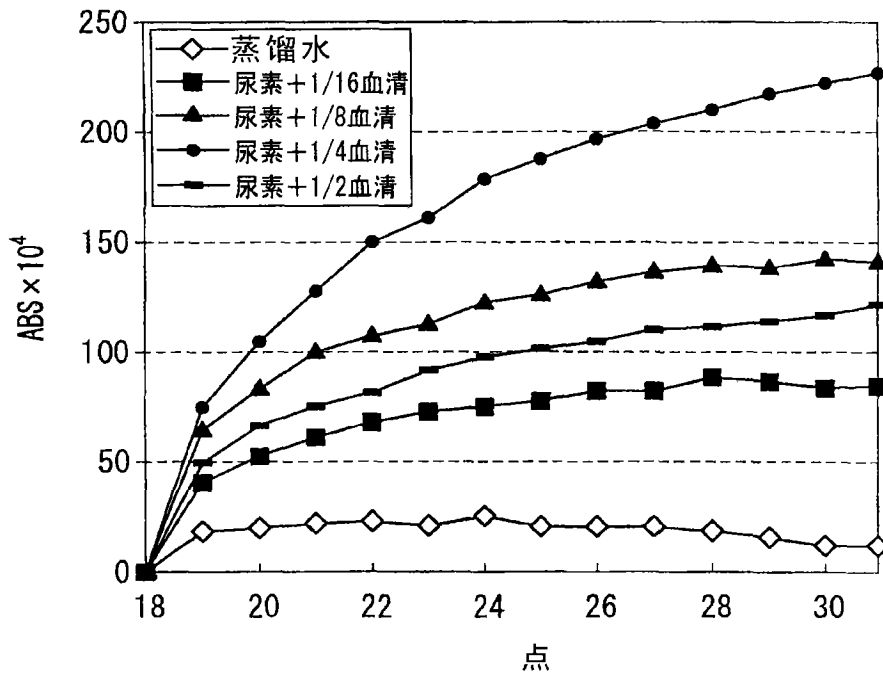


图 1

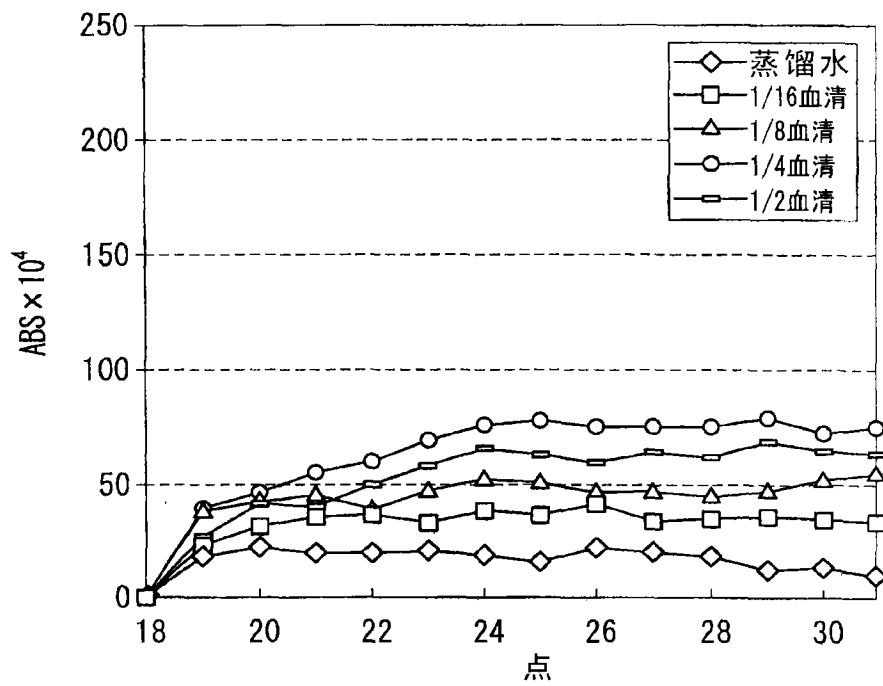


图 2

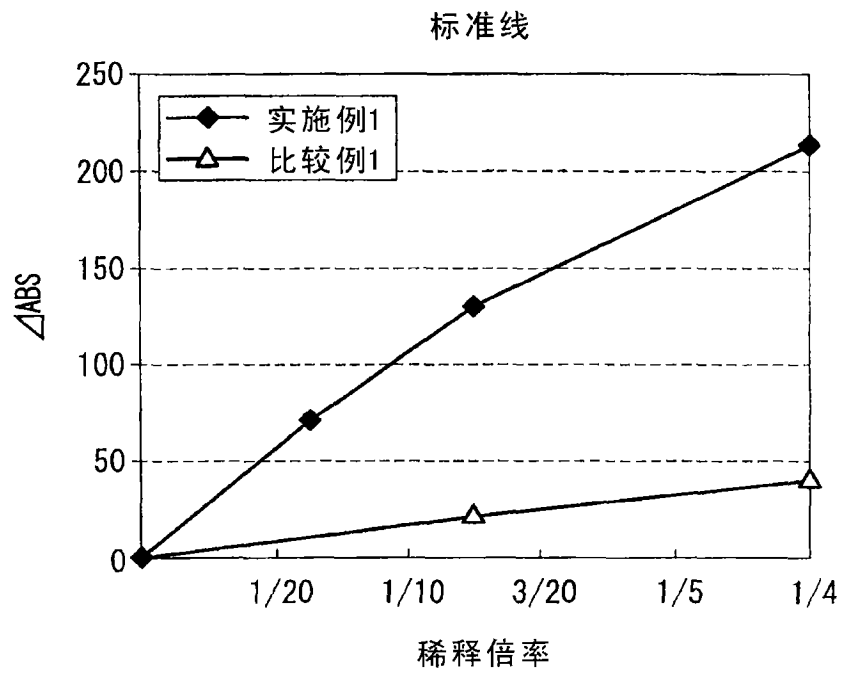


图 3

专利名称(译)	羧甲基精氨酸的免疫测定方法		
公开(公告)号	CN102928604A	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	CN201210284489.0	申请日	2012-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
[标]发明人	富樫智子 八木雅之		
发明人	富樫智子 八木雅之		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6812 G01N33/54313		
优先权	2011173106 2011-08-08 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了羧甲基精氨酸的免疫测定方法，其是羧甲基精氨酸的新的测定方法，所述方法可以简便地以良好精度测定羧甲基精氨酸。其是一种测定试样中的羧甲基精氨酸的方法，包括：用含有尿素的预处理剂处理试样，以及通过免疫学方法测定经预处理的试样中的羧甲基精氨酸。

