



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102246036 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200980149846. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 12. 10

G01N 33/48 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006. 01)

2008-316174 2008. 12. 11 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/006769 2009. 12. 10

(87) PCT申请的公布数据

WO2010/067612 JA 2010. 06. 17

(83) 生物保藏信息

FERM BP-11187 2008. 11. 28

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 宫崎修 藏下俊祐 田久保耕平

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司
11227

代理人 苗堃 金世煜

权利要求书 1 页 说明书 10 页
序列表 1 页 附图 4 页

(54) 发明名称

含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法

(57) 摘要

本发明提供了含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法以及使用该方法的糖化血红蛋白的免疫学测定方法,其处理简便、在保存稳定性以及环境方面不存在问题,并且能够使表位在短时间内充分露出化。一种含有糖化血红蛋白免疫学测定用的糖化血红蛋白的试样的前处理方法,其特征在于,采用含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐的前处理液,对含有糖化血红蛋白的试样进行处理。

1. 一种含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法,用于免疫学测定糖化血红蛋白,其特征在于,用含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐的前处理液,对含有糖化血红蛋白的试样进行处理。

2. 根据权利要求1所述的前处理方法,其中,胍或其盐的使用浓度为 $1 \sim 6\text{mol/L}$,非离子性表面活性剂的使用浓度为 $0.1 \sim 5\%$,亚硝酸盐的使用浓度为 $1 \sim 50\text{mmol/L}$ 。

3. 一种含有糖化血红蛋白的试样的前处理液,用于免疫学测定糖化血红蛋白,其特征在于,含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐。

4. 根据权利要求3所述的前处理液,其中,胍或其盐的使用浓度为 $1 \sim 6\text{mol/L}$,非离子性表面活性剂的使用浓度为 $0.1 \sim 5\%$,亚硝酸盐的使用浓度为 $1 \sim 50\text{mmol/L}$ 。

5. 一种含有糖化血红蛋白的试样中的糖化血红蛋白的免疫学测定方法,其特征在于,用含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐的前处理液,对含有糖化血红蛋白的试样进行处理,接着进行使用抗糖化血红蛋白抗体的免疫学测定。

6. 根据权利要求5所述的测定方法,其中,胍或其盐的使用浓度为 $1 \sim 6\text{mol/L}$,非离子性表面活性剂的使用浓度为 $0.1 \sim 5\%$,亚硝酸盐的使用浓度为 $1 \sim 50\text{mmol/L}$ 。

含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法

技术领域

[0001] 本发明涉及糖化血红蛋白,特别涉及通过免疫学方法来正确测定糖化血红蛋白 A1c 的方法。

背景技术

[0002] 血中的血红蛋白与糖结合的糖化血红蛋白 (Glycohemoglobin),特别是血红蛋白 β 链 N 末端的缬氨酸残基被糖化的血红蛋白 A1c(以下称作“HbA1c”),在临床上由于反映了过去 1~2 个月的平均血糖值,所以作为适于糖尿病诊断或糖尿病过程观察的指标而得到广泛的使用。

[0003] 作为糖化血红蛋白的测定方法,已知的是 HPLC 法以及免疫学测定法,但是在免疫学测定法中,需要使用对血红蛋白的糖化部位具特异性的抗体。目前清楚的是,血红蛋白 β 链 N 末端的糖化部位并非存在于蛋白质的表面,而是包埋于蛋白质的内部,存在于抗体难于结合的地方。因而,为了使识别该表位(epitope)部位的抗体进行高效率的反应,开发出使该表位部位露出到表面的技术(专利文献 1)。

[0004] 作为使表位露出的方法,已知的是通过分别单独使用胍、硫氰酸、或者硫氰酸锂盐;或者通过使用硫氰酸与铁氰化物等氧化剂的组合、离子表面活性剂、非离子性表面活性剂等对含有糖化血红蛋白的试样进行处理的方法(专利文献 1~6)。

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献 1:特开昭 61-172064 号公报

[0007] 专利文献 2:特开平 01-155268 号公报

[0008] 专利文献 3:特开平 03-51759 号公报

[0009] 专利文献 4:特开平 06-11510 号公报

[0010] 专利文献 5:特开 2001-33442 号公报

[0011] 专利文献 6:特开 2007-163182 号公报。

发明内容

[0012] 然而,关于以往的表位露出化方法,例如,胍处理需要加热处理。硫氰酸是对环境有害的物质。铁氰化物等氧化剂具有容易着色等保存稳定性上的问题。非离子性表面活性剂单独用时存在效果并不充分等问题。

[0013] 因此,本发明的课题在于提供含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法以及使用该方法的糖化血红蛋白的免疫学测定法,其处理简便、在保存稳定性以及环境方面不存在问题,并且能够使表位在短时间内充分露出。

[0014] 因此,本发明人在对于糖化血红蛋白的高效且简便的表位露出化方法进行了研究之后,发现如果用含有胍与非离子性表面活性剂和 / 或亚硝酸盐的溶液来处理含有糖化血红蛋白的试样,则与分别单独使用胍、非离子性表面活性剂以及亚硝酸盐的情况相比,可获得非常优异的表位露出化效果,即使不施加加热处理也可使糖化部分在短时间内高效地露

出,使糖化血红蛋白的正确的免疫学测定成为可能,从而完成了本发明。

[0015] 即,本发明提供了含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法,用于免疫学测定糖化血红蛋白,其特征在于,用含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐的前处理液,对含有糖化血红蛋白的试样进行处理。

[0016] 并且,本发明提供了含有糖化血红蛋白的试样的前处理液,用于免疫学测定糖化血红蛋白,其特征在于,含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐。

[0017] 进一步,本发明还提供了含有糖化血红蛋白的试样中糖化血红蛋白的免疫学测定方法,其特征在于,将含有糖化血红蛋白的试样用含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐的前处理液进行处理,然后用抗糖化血红蛋白抗体进行免疫学测定。

[0018] 根据本发明的前处理方法,通过短时间的简便处理,试样中的糖化血红蛋白中的糖化部分会高效率地露出。因此,如果使用该处理过的试样来进行使用抗糖化血红蛋白抗体的免疫学测定,则使正确地定量糖化血红蛋白成为可能。

附图说明

[0019] 图1表示用竞争ELISA法对各试剂的表位露出化效果进行比较的结果。

[0020] 图2表示用竞争ELISA法对本发明试剂的表位露出化效果中pH的影响进行研究的结果。

[0021] 图3表示用竞争ELISA法对本发明试剂的保存稳定性进行研究的结果。

[0022] 图4表示根据使用本发明试剂的夹层ELISA进行的HbA1c浓度测定系以及HbA0浓度测定系中的校正曲线。

[0023] 图5表示根据免疫色谱法进行的HbA1c的测定方法的概略图。

具体实施方式

[0024] 本发明的含有糖化血红蛋白的试样为糖化血红蛋白测定用的被检试样,可举出例如血液、红血球成分等。在此,作为糖化血红蛋白,优选血红蛋白 β 链被糖化的糖化血红蛋白,特别优选HbA1c。

[0025] 此外,利用本发明方法而露出的表位部位为血红蛋白的糖化区域,例如血红蛋白 β 链的糖化N末端区域,更优选含有血红蛋白 β 链的N末端缬氨酸被糖化的肽的区域。

[0026] 本发明的前处理用前处理液中含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐。根据本发明,通过将成分(A)与成分(B)合用,与分别单独使用成分(A)或者成分(B)的情况相比,可获得非常优异的表位露出化效果。

[0027] 作为成分(A)胍,尽管可使用胍本身,但是从表位露出化效果方面考虑而特别优选使用胍盐。作为胍盐,优选胍盐酸盐。从表位露出化效果以及抗体的反应性方面来考虑,胍的使用浓度优选 $1\text{mol/L} \sim 6\text{mol/L}$,特别优选 $2.5\text{mol/L} \sim 3.5\text{mol/L}$ 。

[0028] 作为成分(B)非离子性表面活性剂,可举出聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯醚、聚氧乙烯脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、烷基苷、烷酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、(烷基氨基甲酰基)甲基吡喃葡萄糖苷、烷基吡喃葡萄糖苷、脱氧胆酸酰胺类、皂角苷等。更具体地,可举出聚氧乙烯 C_6-C_{24} 烷基醚、聚氧乙烯 C_6-C_{24}

烷基苯基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯醚、聚氧乙烯 C₆-C₂₄ 脂肪酸酯、蔗糖 C₆-C₂₄ 脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐 C₆-C₂₄ 脂肪酸酯、C₆-C₂₄ 烷基苷、C₆-C₂₄ 烷酰基甲基葡萄糖酰胺、(C₆-C₂₄ 烷基氨基甲酰基) 甲基吡喃葡萄糖苷、C₆-C₂₄ 烷基吡喃葡萄糖苷、N, N- 双 [3-(D- 葡萄糖酰氨基) 丙基]-3, 12- 二羟基胆甾烷-24- 胺、皂角苷。

[0029] 从表位露出化效果方面以及抗体反应性方面来考虑, 非离子性表面活性剂的使用浓度优选 0.1%~5%, 特别优选 0.2%~1.5%。

[0030] 作为成分 (B) 亚硝酸盐, 可以举出亚硝酸钠、亚硝酸钾等亚硝酸的碱金属盐。

[0031] 从表位露出化效果方面以及抗体反应性方面来考虑, 亚硝酸盐的使用浓度优选 1mmol/L~50mmol/L, 特别优选 5mmol/L~15mmol/L。

[0032] 非离子性表面活性剂与亚硝酸盐可分别单独使用, 也可合用, 但是从缩短处理时间、提高定量性方面来考虑, 更加优选合用。

[0033] 此外, 关于本发明前处理液中的成分 (A) 与成分 (B) 的含有比 (质量比), 从表位的露出化效果以及抗体的反应性方面来考虑并不特别限定, 上述各成分的浓度范围, 即, (A) 的浓度范围可为 1~6mol/L, (B) 非离子性表面活性剂的浓度范围可为 0.1~5%, 并且 (B) 亚硝酸盐的浓度范围可为 1~50mmol/L。

[0034] 本发明的前处理液优选使用含有前述成分 (A) 以及 (B) 的水溶液。并且, 该水溶液的 pH 优选 4.0~9.0, 更优选 4.5~7.0。对于这些 pH 的调整, 也可添加适宜的缓冲剂。作为缓冲剂, 可使用柠檬酸、邻苯二甲酸、醋酸、琥珀酸、卡可基酸、马来酸、咪唑、三甲基吡啶、磷酸、Johnson-Lindsay 等的通用缓冲剂; 2- 吗啉乙磺酸 (以下称作“MES”)、二 (2- 羟乙基) 亚氨基三 (羟甲基) 甲烷 (以下称作“Bis-Tris”)、哌嗪-N, N'- 二 (2- 乙烷磺酸) (以下称作“PIPES”) 等的 Good 缓冲剂。

[0035] 在使用本发明的前处理液来处理含有糖化血红蛋白的试样时, 可向含有糖化血红蛋白的试样溶液中添加前处理液并搅拌。温度优选 15°C~50°C, 更优选 20°C~40°C。处理时间优选 30 秒~30 分, 更优选 1 分钟~5 分钟。

[0036] 含有糖化血红蛋白的试样中的糖化血红蛋白, 通过前述处理, 糖化部位高效率地露出。因此, 关于该处理试样, 如果进行使用抗糖化血红蛋白抗体的免疫学测定, 则可正确定量含有糖化血红蛋白的试样中糖化血红蛋白的含有量。

[0037] 本发明方法中的糖化血红蛋白测定方法可采用通常的免疫测定方法中的任意一种。在此, 作为免疫测定方法, 可举出夹层 ELISA 法、竞争 ELISA 法、免疫色谱法、乳胶凝集法、竞争乳胶凝集法等。以下, 将 HbA1c 的测定作为示例来进行说明。

[0038] 例如, 用夹层 ELISA 法进行测定时, 可将纯化的 HbA1c 作为标准品, 用以下方法进行 HbA1c 定量。即, 在固定有抗 HbA1c 抗体的 ELISA 板上, 添加用本发明的前处理液处理过的样品试样并进行反应之后, 与酶标记的抗血红蛋白抗体 (以下称作“抗 Hb 抗体”) 进行反应, 从显色后的吸光度变化, 可特异性地定量试样中存在的 HbA1c。

[0039] 在用乳胶凝集法进行测定时, 可将纯化 HbA1c 作为标准品, 用以下方法进行定量。即, 通过使抗 HbA1c 抗体在作为不溶性载体的乳胶粒子上敏化, 并且与用本发明前处理液处理过的样品试样以及抗 Hb 单克隆抗体进行接触, 从而使抗体敏化乳胶粒子介由试样中的 HbA1c 彼此交联, 产生凝集, 因此从该凝集度的变化可特异地定量该 HbA1c。

[0040] 在用竞争乳胶凝集法进行测定时, 可将纯化 HbA1c 作为标准品, 用以下方法进行

定量。即,通过使 HbA1c 的 β 链 N 末端的糖化肽,例如糖化 6 残基肽 (f-VHLTPE (序列号 1)) 在作为不溶性载体的乳胶粒子上敏化,并且与用本发明前处理液处理过的样品试样以及抗 HbA1c 抗体进行接触,对于 f-VHLTPE 敏化乳胶粒子与抗 HbA1c 抗体的凝集反应,样品试样中的 HbA1c 显示出竞争阻碍,从该竞争阻碍的变化可特异地定量样品试样中的 HbA1c。

[0041] 作为乳胶凝集法等中的抗体敏化乳胶粒子的乳胶粒子,只要是在利用乳胶凝集反应的免疫学凝集反应以及凝集阻止反应中一般使用的微粒子载体,就没有特别地限制,但是优选可在工业上大量生产的有机类微粒子。作为这样的有机类微粒子,可举出例如苯乙烯、氯乙烯、丙烯腈、醋酸乙烯、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯等的乙烯类单体的均聚物或共聚物;苯乙烯-丁二烯共聚物、甲基丙烯酸酯-丁二烯共聚物等的丁二烯类共聚物等。此外,在这样的有机类微粒子中,还可优选使用结合有羧基、伯氨基、氨基甲酰基、羟基、醛基等官能团的反应性有机类微粒子。上述乳胶粒子中,从抗原或抗体的吸附性优异,可长期稳定地保持生物学活性方面来考虑,优选聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物等的聚苯乙烯类乳胶粒子。

[0042] 对于乳胶粒子的形状不作特别限制,但是希望其平均粒径充分大,以可肉眼或者光学地检出作为乳胶粒子表面蛋白质与测定对象物质的凝集反应的结果所产生的凝集体。作为优选的平均粒径为 $0.02 \sim 1.6 \mu\text{m}$,特别优选 $0.03 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 。

[0043] 对于使抗 HbA1c 抗体在乳胶粒子上敏化的方法并不作特别限定,可使用公知的方法。例如,可举出物理吸附到乳胶粒子表面的方法、共价结合到具有官能团的乳胶粒子表面上的方法、以及通过免疫学结合而敏化方法等。

[0044] 用免疫色谱法进行测定时,因为血红蛋白的 β 链 N 末端未被修饰的血红蛋白 A0 (以下称作“HbA0”)与 HbA1c 可同时测定,所以特别适宜。例如,如图 5 所示,使用将抗 HbA0 抗体以及抗 HbA1c 抗体各自固定到分别的部位 (A 线与 B 线) 的免疫色谱支持体。将用本发明的前处理液处理的含有 HbA1c 的样品滴落到样品垫上。滴落的试样由于毛细管现象而展开,到达 A 线时仅试样中的 HbA0 反应,到达 B 线时仅试样中的 HbA1c 反应。其它血红蛋白未反应而移动至垫末端。如果用免疫色谱阅读器测定 A 线与 B 线的色浓度、反射强度以及吸光度等,则可分别定量试样中的 HbA0 与 HbA1c。在此,将 HbA0 的定量值设为 A、HbA1c 的定量值设为 B 时,还可用 $\text{HbA1c}(\%) = (B/(A+B)) \times 100$,求得 HbA1c (%)。

[0045] 在此,作为 HbA1c 抗体,可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,例如可使用专利文献 (特开昭 61-172064 号公报、特开平 6-66796 号公报) 中记载的抗体等。

[0046] 实施例

[0047] 以下列举实施例来更加详细地说明本发明。

[0048] 实施例 1 (表位露出效果的比较)

[0049] (I) 材料与方法

[0050] (1) 纯化 HbA0 以及纯化 HbA1c 的制备

[0051] 使用人红血球溶血液,通过非专利文献 (Melisenda J. McDonald 等, JBC, 253(7), 2327-2332, 1978) 记载的使用 Bio-Rex70 (Bio-Rad 公司) 的离子交换色谱法,纯化 HbA0 以及 HbA1c,用于以后的实验。

[0052] (2) 各种肽以及糖化血红蛋白的制备

[0053] 通过使用肽自动合成装置的 Fmoc 法来合成以及纯化各序列的肽。各肽的纯度

用 HPLC 确认为 95% 以上。另外,用质量分析装置 (MALTI-TOF) 确认分子量与理论值相同。用专利文献 (特开昭 61-172064 号公报) 记载的方法来合成以及纯化糖化肽。即,使各序列的肽与葡萄糖在无水吡啶中反应来合成糖化肽,用 HPLC 进行纯化。用质量分析装置 (MALTI-TOF) 确认各糖化肽的分子量与理论值相同,即与各肽的分子量加上 162 所得的分子量相同。

[0054] (3) 肽结合蛋白以及糖化肽结合蛋白的制备

[0055] 在上述 (2) 中制备的肽或者糖化肽中,关于将 C 末端合成为半胱氨酸 (C) 的肽 (例如, VHLTC (序列号 2), f-VHLTC), 按照如下与载体蛋白结合。即,将按照 5mg/mL 的浓度溶解在含有 0.15mol/L NaCl 的 20mmol/L pH7.2 磷酸缓冲液 (以下称作“PBS”) 中的肽 (VHLTC) 或者糖化肽 (f-VHLTC) 与按照 5mg/mL 的浓度溶解于纯化水中的马来酰亚胺活化卵清蛋白 (OVA) (PIERCE 公司制) 按照 1 : 1 进行混合之后,在室温下边缓慢旋转边进行 2 小时温育,用 PBS 透析而使用 (VHLTC-OVA, f-VHLTC-OVA)。

[0056] (4) 抗血红蛋白抗体、抗 HbA1c 抗体以及抗 HbA0 抗体的制备

[0057] 抗血红蛋白抗体是使用将上述 (1) 中的纯化 HbA0 作为免疫原通过常规方法制作的小鼠单克隆抗体。抗 HbA1c 抗体是使用按照专利文献 (特开昭 61-172064 号公报) 记载的方法制作的小鼠单克隆抗体。即,将在上述 (2) 中合成的糖化肽 (f-VHLTPEEKYYC (序列号 3)) 与血蓝蛋白 ((keyhole limpet hemocyanin, 以下称作 KLH) 结合,将其作为免疫原。关于杂交瘤细胞的筛选,选择在抗原固相化 ELISA 中与纯化 HbA1c 反应而与纯化 HbA0 不反应的细胞株。抗 HbA0 抗体是使用将在上述 (3) 中制备的肽结合蛋白 (VHLTC-OVA) 作为免疫原,按照常规方法制作的小鼠单克隆抗体。此时,关于杂交瘤细胞的筛选,选择在抗原固相化 ELISA 中与纯化 HbA0 反应而与纯化 HbA1c 不反应的细胞株。

[0058] 关于抗 HbA0 抗体,将对前述筛选中选择的细胞株进行克隆,将产生 HbA0 单克隆抗体的杂交瘤细胞保藏于独立行政法人产业技术综合研究所 (2008 年 11 月 28 日,日本茨城县筑波市东一丁目 1 番地 1 中央第 6)。保藏编号如下所示。

[0059] 抗体编号 :85201

[0060] 保藏编号 :FERM BP-11187

[0061] (5) 样品处理方法

[0062] 将人红血球按照 1 : 50 的比率与各处理液混合,在 25°C 下处理 10 分钟。之后,将该混合液用 1% BSA-0.05% Tween20-PBS (以下称作“1% BSA-PBST”) 稀释至 4 倍 (HbA1c 浓度 :64 μ g/mL)、40 倍 (HbA1c 浓度 :6.4 μ g/mL)、或者 400 倍 (HbA1c 浓度 :0.64 μ g/mL) 的各浓度,供给后述的竞争 ELISA。

[0063] (6) 竞争 ELISA

[0064] a. 将在上述 (3) 中制备的 f-VHLTC-OVA 用 PBS 稀释至 1 μ g/mL 的浓度后,按照 50 μ L/孔分别注入到 96 孔板上,在 4°C 下静置一夜。

[0065] b. 用 0.05% Tween20-PBS (以下称作“PBST”) 按照 400 μ L/孔洗涤 3 次后,按照 100 μ L/孔分别注入封闭液 (1% BSA-PBST),在室温下静置 1 小时。

[0066] c. 用 PBST 洗涤 3 次后,按照 25 μ L/孔分别注入在上述 (5) 中制备的样品液。

[0067] d. 接着,按照 25 μ L/孔分别注入用 1% BSA-PBST 稀释至 0.5 μ g/mL 的抗 HbA1c 抗体,在室温下静置 1 小时。

[0068] e. 用 PBST 洗涤 3 次后, 按照 50 μ L/ 孔分别注入用 1 % BSA-PBST 将 HRP-GtF(ab')₂-Anti-Mouse Ig's (Biosource 公司制) 稀释 5000 倍的溶液, 在室温下静置 1 小时。

[0069] f. 用 PBST 洗涤 3 次后, 分别注入 (50 μ L/ 孔) 含有邻苯二胺盐酸盐的显色液 (将邻苯二胺盐酸盐 (东京化成公司制) 以 2mg/mL、将过氧化氢以 0.02% 浓度溶解于 pH5.0 的柠檬酸缓冲液 (以下称作“OPD 显色液”)), 在室温下静置 10 分钟。

[0070] g. 按照 50 μ L/ 孔分别注入 0.75mol/L 硫酸使反应停止后, 用平板阅读器来测定 492nm 的吸光度。

[0071] (7) 阻碍率的计算

[0072] 根据下式, 从在上述 (6) 中求得的吸光度来计算阻碍率, 作为各试剂的表位露出化效果的指标。

[0073] 阻碍率 (%) = [(A-B)/A] \times 100

[0074] A : 空白样品的吸光度

[0075] B : 添加样品时的吸光度

[0076] (II) 结果

[0077] (1) 各试剂的露出效果的比较

[0078] 作为前处理液, 使用 3mol/L 胍盐酸盐、1 % 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯 (Tween20)、10mmol/L 亚硝酸钠的各水溶液; 6mol/L 胍盐酸盐与 2 % 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯的 1 : 1 的混合液 (胍 + 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯); 6mol/L 胍盐酸盐与 20mmol/L 亚硝酸钠的 1 : 1 的混合液 (胍 + NaNO₂); 2 % 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯与 20mmol/L 亚硝酸钠的 1 : 1 的混合液 (聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯 + NaNO₂); 以及 5mmol/L 的 MES 缓冲液 (pH6.0), 按照上述 (I) (5) 对样品进行处理之后, 用竞争 ELISA 来比较露出化效果。其结果是, 如图 1 所示, 可清楚看出胍 + 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯、以及胍 + NaNO₂ 比单独使用胍具有更显著的露出化效果。另一方面, 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯、亚硝酸钠以及 MES 缓冲液单独使用, 以及聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯 + NaNO₂ 几乎没有露出化效果。由此可获得如下启示, 通过将聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯或者亚硝酸钠添加至胍盐酸盐水溶液中, 表位露出效果会变得显著高。

[0079] (2) 表面活性剂的种类

[0080] 作为前处理液, 使用将各种非离子性表面活性剂以终浓度 1 %、0.5 % 或者 0.25 % 添加至 3mol/L 胍盐酸盐水溶液中所得的试剂, 对样品进行处理后, 用竞争 ELISA 对各试剂的表位露出化效果进行比较。其结果是, 如表 1 所示, 可清楚看出与单独使用胍盐酸盐的试剂相比, 添加了各表面活性剂的试剂具有显著高的表位露出效果。由此可获得如下启示, 通过将非离子性表面活性剂添加至胍盐酸盐水溶液中, 表位的露出效果会变高。

[0081] 表 1

[0082]

表面活性剂	浓度 (%)	阻碍率 (%)	表面活性剂	浓度 (%)	阻碍率 (%)
胍	—	40			
聚氧乙烯(23)月桂醚	1	71	聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(Tween80)	1	72
	0.5	78		0.5	65
	0.25	68		0.25	58
6-D-(N-庚基氨基甲酰基)- α -D-吡喃葡萄糖苷(HECAMEG)	1	79	聚氧乙烯壬基苯基醚(Nonidet P40)	1	76
	0.5	56		0.5	69
	0.25	46		0.25	66
n-辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺(MEGA-8)	1	53	蔗糖单月桂酸酯	1	71
	0.5	53		0.5	74
	0.25	53		0.25	70
n-壬酰基-N-甲基葡萄糖酰胺(MEGA-9)	1	78	聚氧乙烯辛基苯基醚(Triton X-100)	1	70
	0.5	67		0.5	67
	0.25	56		0.25	65
n-癸酰基-N-甲基葡萄糖酰胺(MEGA-10)	1	72	聚氧乙烯辛基苯基醚(Triton X-114)	1	70
	0.5	75		0.5	65
	0.25	55		0.25	60
n-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷	1	72	n-十二烷基- β -D-麦芽糖苷(DDM)	1	64
				0.5	71
				0.25	67
聚氧乙烯(80)聚氧丙烯(30)聚氧乙烯(80)(Pluronic F-68)	1	66	辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷	1	74
	0.5	46		0.5	74
				0.25	51
聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(Tween20)	1	79	皂角苷	1	60
	0.5	72		0.5	48
	0.25	59			

[0083] (3) pH 的影响

[0084] 作为前处理液,使用按照终浓度含有 3mol/L 胍盐酸盐以及 1% 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(Tween20)的各 pH 缓冲液(pH4.5、pH5.5:柠檬酸-NaHPO₄;pH6.0、pH7.0:KH₂PO₄-Na₂HPO₄;pH7.5、pH8.0、pH9.0:Tris-HCl,各 20mmol/L),对样品进行处理后,用竞争 ELISA 来比较各试剂的表位露出化效果。其结果是,如图 2 所示,可清楚看出 pH4.5 ~ pH7,特别是 pH4.5 ~ pH6 的酸性区域中表位露出化效果高。

[0085] (4) 处理时间 1 分钟的比较

[0086] 将样品处理时间从 10 分钟改变到 1 分钟,进行各试剂的表位露出化效果的比较。作为前处理液,使用向 5mmol/L-MES(pH6.0)以及该缓冲液中添加以下各试剂所得的试剂,即添加 3mol/L-胍盐酸盐、10mmol/L-亚硝酸钠、1% 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(Tween20)、3mol/L-胍盐酸盐-1% 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(胍+聚氧乙烯山梨醇

酞单月桂酸酯)、3mol/L- 胍盐酸盐 -10mmol/L- 亚硝酸钠 (胍 +NaNO₂)、10mmol/L- 亚硝酸钠 -1% 聚氧乙烯山梨醇酞单月桂酸酯 (聚氧乙烯山梨醇酞单月桂酸酯 +NaNO₂)、或者 3mol/L- 胍盐酸盐 -10mmol/L- 亚硝酸钠 -1% 聚氧乙烯山梨醇酞单月桂酸酯 (胍 +NaNO₂+ 聚氧乙烯山梨醇酞单月桂酸酯)。按照相对于 1 体积红血球各前处理液为 50 体积的比例进行混合后,在 25℃ 下处理 1 分钟,其后按照与上述 (I) (5) 同样,将样品用 1% BSA-PBST 稀释,用竞争 ELISA 进行露出化效果的比较。其结果是,如表 2 所示,可清楚看出,添加了胍 +NaNO₂+ 聚氧乙烯山梨醇酞单月桂酸酯的试剂具有最高的露出效果。

[0087] 表 2

处理液	阻碍率 (%)
MES, pH6.0	0.0
胍	2.9
NaNO ₂	0.0
聚氧乙烯单月桂酸酯 (Tween20)	2.0
胍+聚氧乙烯单月桂酸酯 (Tween20)	30.5
胍+NaNO ₂	28.7
NaNO ₂ +聚氧乙烯单月桂酸酯 (Tween20)	1.4
胍+NaNO ₂ +聚氧乙烯单月桂酸酯 (Tween20)	37.9

[0088]

[0089] 实施例 2 (试剂的稳定性)

[0090] (I) 材料与方法

[0091] 为了研究本发明前处理液的保存稳定性,将前处理液 (1% 聚氧乙烯山梨醇酞单月桂酸酯 (Tween20)-10mmol/L NaNO₂-3mol/L 胍盐酸盐 -5mol/L MES 缓冲液, pH6.0) 在 4℃ 或 37℃ 下放置 8 日之后,与实施例 1 同样进行表位露出效果的研究,与当天制备的同一配方试剂的表位露出效果进行比较。

[0092] (II) 结果

[0093] 其结果是,如图 3 所示,关于表位露出效果,即使是在 37℃ 下放置 8 日的试剂也与当日制备的试剂等同。由此可确认,本发明的表位露出试剂具有良好的保存稳定性。

[0094] 实施例 3 (实用性的确认)

[0095] (I) 材料与方法

[0096] (1) 抗 HbA1c 抗体、抗血红蛋白抗体、以及抗 HbA0 抗体的制备

[0097] 与实施例 1 (3) 同样,进行测定中所用的抗 HbA1c 抗体、抗血红蛋白抗体、以及抗 HbA0 抗体的制备。

[0098] (2) 生物素标记抗血红蛋白抗体的制备

[0099] 使用市售的生物素标记试剂 (PIERCE 公司、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin) 对上述 (1) 的抗血红蛋白抗体进行如下标记。将以 10mg/mL 的浓度溶解于 PBS 的生物素标记试剂 0.05mL 添加到 1mg/mL 的浓度的抗血红蛋白抗体液 1mL,在室温下使其反应 2 小时。反应后,用 PBS 进行透析用于测定。

[0100] (3) 样品以及标准试样的制备

[0101] 从公司内部志愿者采血到加入 EDTA-2Na 的真空采血管 (Sekisui Medical 公司

制)中,通过离心分离来分离红血球。将该红血球 4 μ L 与本发明前处理液(1%聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(Tween20)-10mmol/L NaNO₂-3mol/L 胍盐酸盐-5mmol/L MES 缓冲液, pH6.0)200 μ L 进行混合。在 25℃ 下放置 10 分钟后,将该混合液用 3%脱脂乳-PBST 进行梯度稀释,用作下述夹层 ELISA 的样品。此外,标准试样采用通过下述 HPLC 法预先求得 HbA1c 浓度以及 HbA0 浓度的别人的样品。

[0102] (4) 利用夹层 ELISA 测定 HbA0 浓度

[0103] a. 将抗 HbA0 抗体用 PBS 稀释到 5 μ g/mL 的浓度。将其按照 50 μ L/孔分别注入 ELISA 板中,在 4℃ 下静置一夜。

[0104] b. 用 PBST(350 μ L/孔)洗涤 3 次后,将 1% BSA-PBST 按照 100 μ L/孔分别注入,在室温下静置 1 小时。

[0105] c. 用 PBST 洗涤 3 次后,将在上述(3)中处理过的标准试样或者样品按照 50 μ L/孔分别注入,在室温下静置 1 小时。

[0106] d. 用 PBST 洗涤 3 次后,将用 1% BSA-PBST 稀释到 1 μ g/mL 的浓度的生物素标记抗血红蛋白抗体按照 50 μ L/孔分别注入,在室温下静置 1 小时。

[0107] e. 用 PBST 洗涤 3 次后,将用 1% BSA-PBST 稀释到 1 μ g/mL 的浓度的 HRP-Streptavidin(PIERCE 公司制)按照 50 μ L/孔分别注入,在室温下静置 30 分钟。

[0108] f. 用 PBST 洗涤 3 次后,分别注入(50 μ L/孔)OPD 显色液,在室温下静置 10 分钟。

[0109] g. 按照 50 μ L/孔分别注入 0.75mol/L 硫酸使反应停止后,用平板阅读器测定 492nm 的吸光度。

[0110] h. 基于各浓度的标准试样的吸光度来作成校正曲线,用此来求得样品的浓度。

[0111] (5) 利用夹层 ELISA 测定 HbA1c 浓度

[0112] 按照与上述(4)同样的方法,用抗 HbA1c 抗体代替抗 HbA0 抗体,测定 HbA1c 浓度。

[0113] (6) HbA1c 值的计算

[0114] 基于在上述(4)以及(5)中求得的 HbA0 浓度以及 HbA1c 浓度,根据下述计算式求得 HbA1c 值(HbA1c 的含有率)。

[0115] < 计算式 >

[0116]
$$\text{HbA1c 含有率}(\%) = \frac{\text{HbA1c 量(浓度)}}{\text{HbA1c 量(浓度)} + \text{HbA0 量(浓度)}} \times 100$$

[0117] (7) 利用 HPLC 法测定 HbA1c 值

[0118] 使用东曹自动糖化血红蛋白分析仪 HLC-723G8,测定全血红蛋白中的 HbA1c 的比例。

[0119] (II) 结果

[0120] (1) 校正曲线

[0121] 使用标准试样,制作 HbA0 浓度测定系以及 HbA1c 浓度测定系的校正曲线。如图 4 所示,可确认吸光度在两种测量体系中均为依赖各抗原浓度地上升。

[0122] (2) 与利用 HPLC 法的测定值的比较

[0123] 将使用本发明的前处理液用上述夹层 ELISA 法求得的 HbA1c 值与用 HPLC 法求得的 HbA1c 值进行比较。将从 5 名健康者采集的样品用两种方法分别求得 HbA1c 值。其结果是,如表 3 所示,用两种方法求得的 HbA1c 值显示出大致相同的值。

[0124] 表 3

[0125]

No.	HbA1c (%)	
	东曹HPLC	夹层ELISA
1	5.2	5.3
2	5.2	4.5
3	4.8	4.4
4	4.8	5.2
5	5.0	5.5

[0126] 从以上结果可确认,本发明的前处理液可用于 HbA0 浓度、HbA1c 浓度、以及 HbA1c 值 (HbA1c 的比例) 的定量测定。

[0001]

序列表

<110> 积水医疗株式会社
 <120> 含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法
 <130> DC0074
 <150> JP2008-316174
 <151> 2008-12-11
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 基于糖化血红蛋白而设计的肽
 <400> 1
 Val His Leu Thr Pro Glu
 1 5
 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 基于糖化血红蛋白而设计的肽
 <400> 2
 Val His Leu Thr Cys
 1 5
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 基于糖化血红蛋白而设计的肽
 <400> 3
 Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Tyr Tyr Cys
 1 5 10

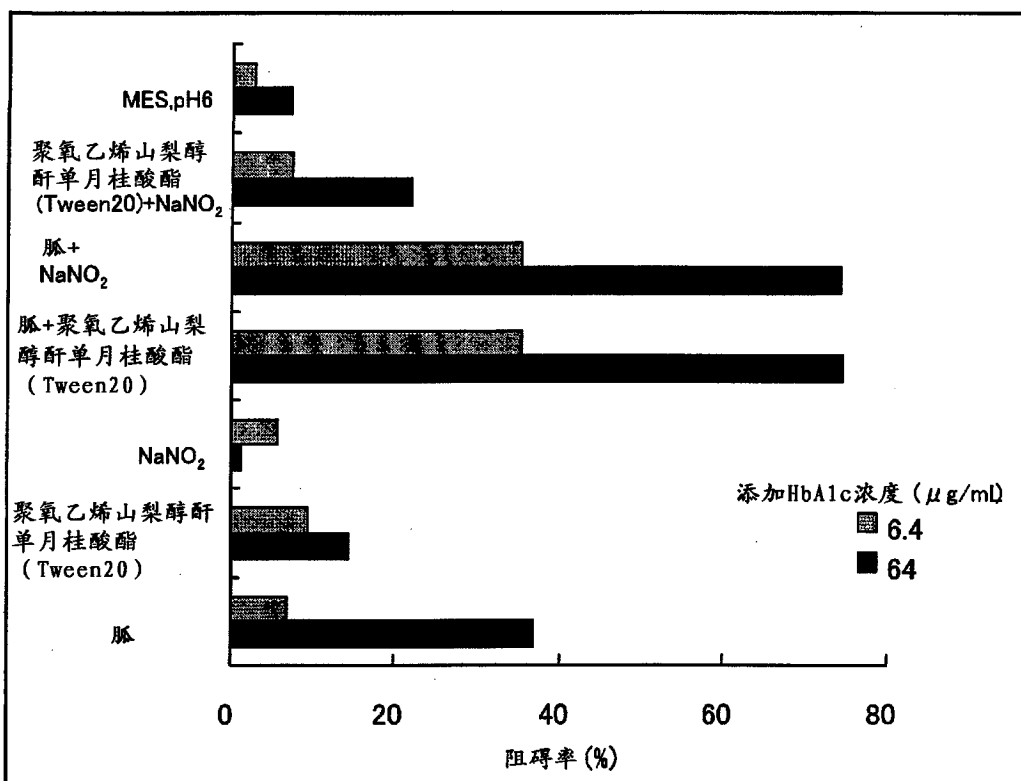


图 1

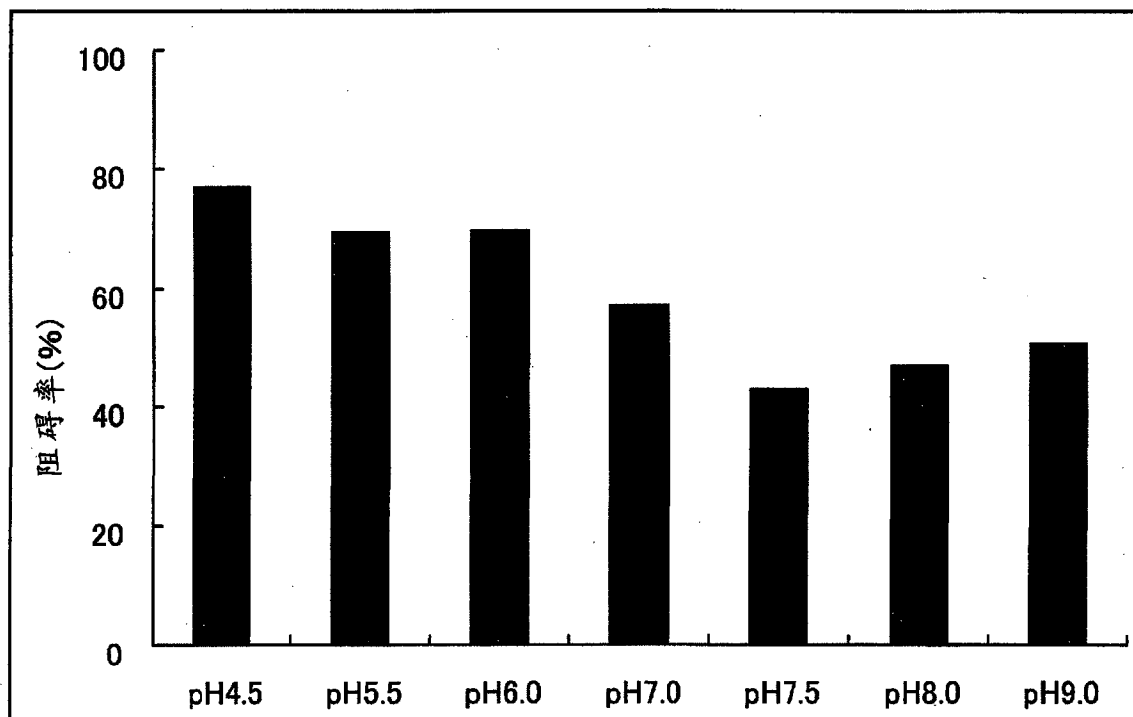


图 2

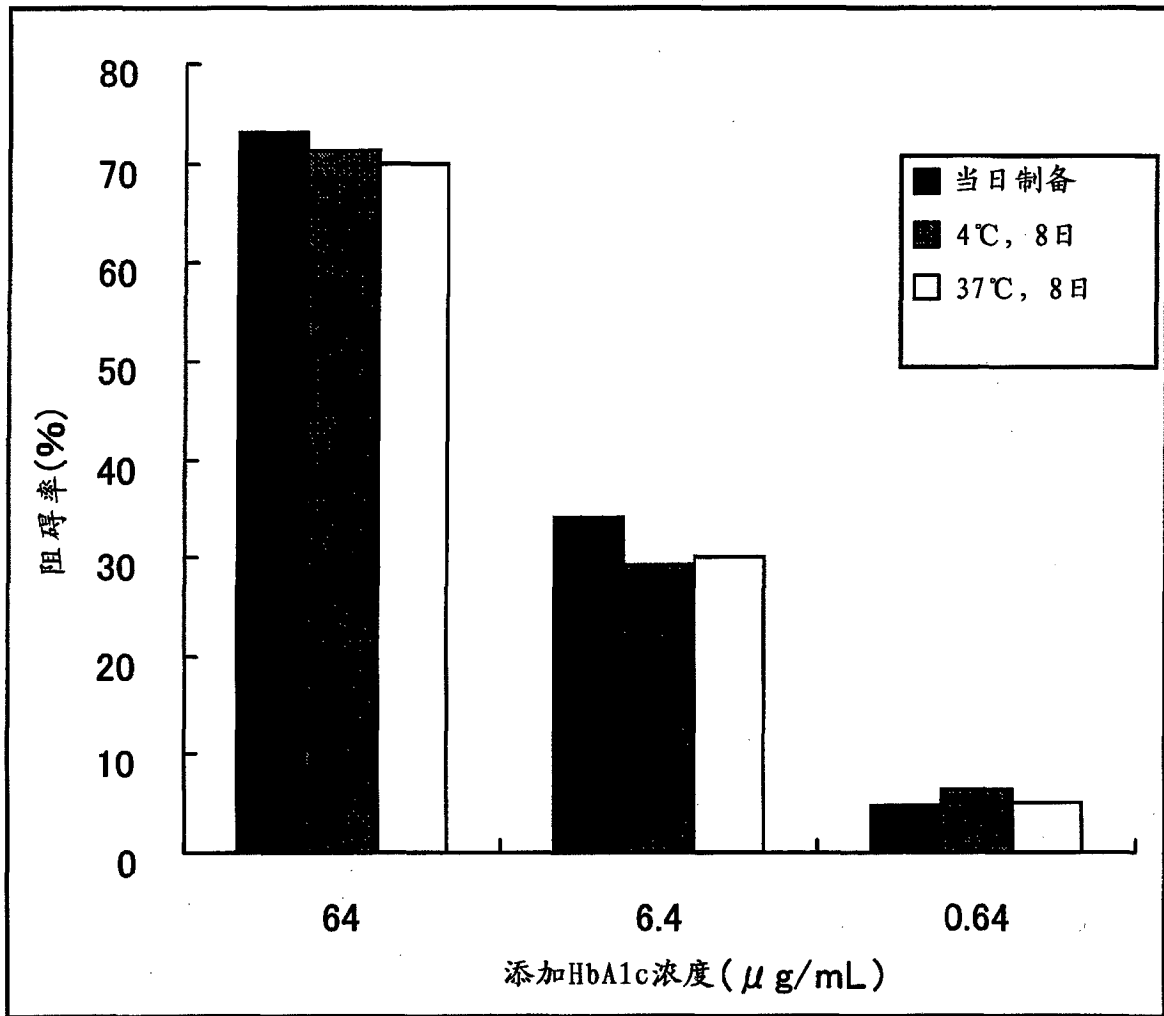


图 3

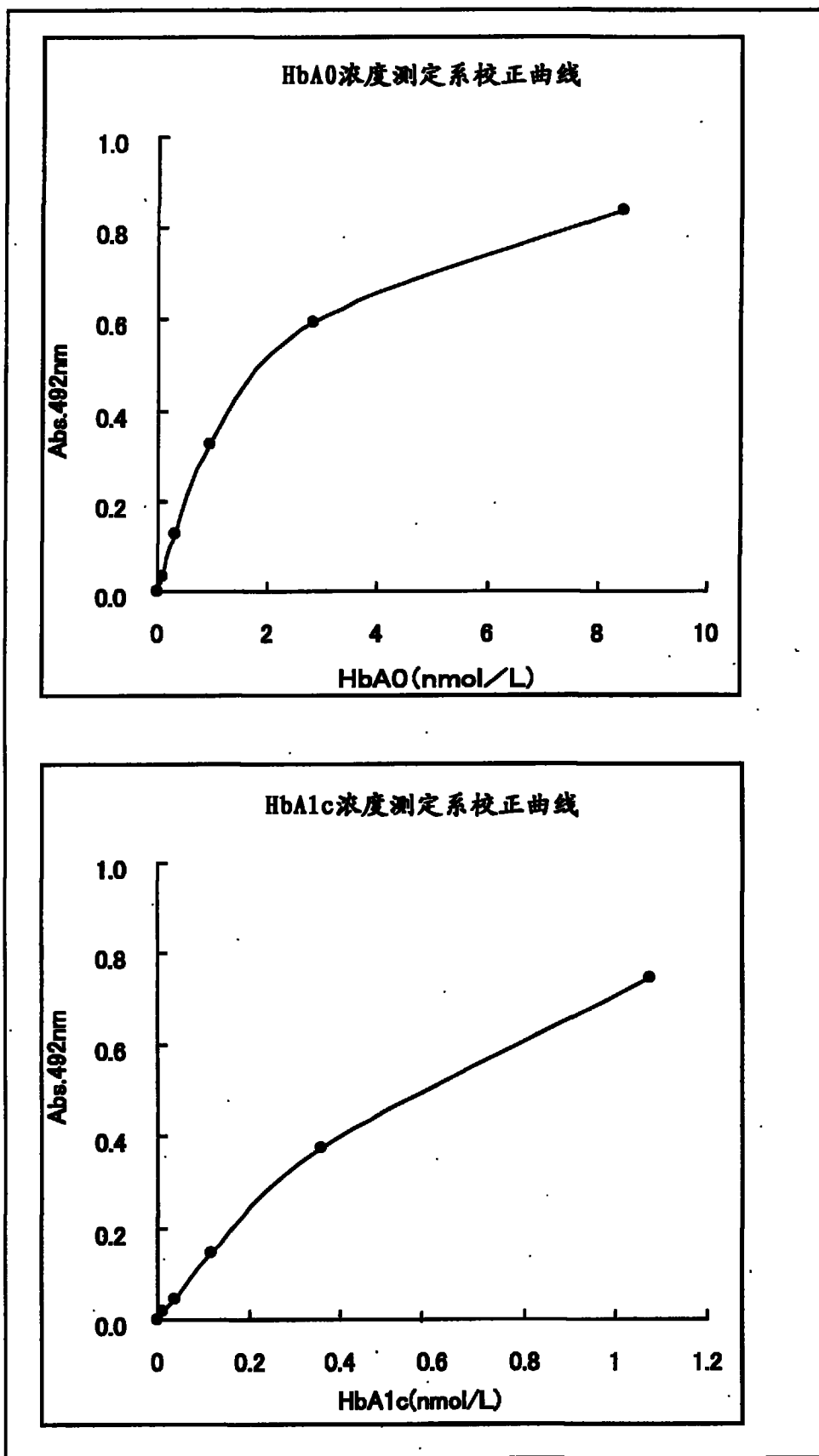


图 4

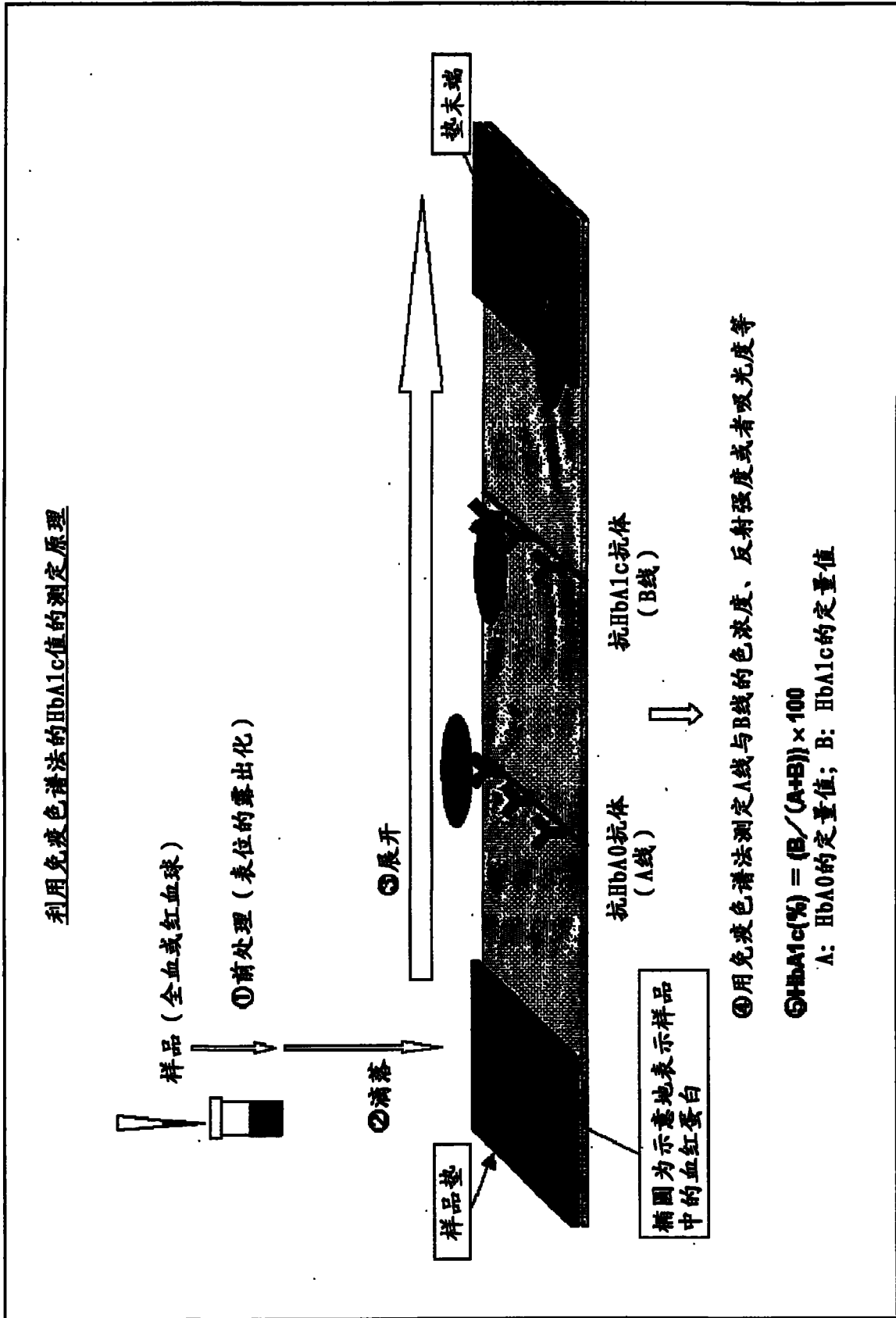


图 5

专利名称(译)	含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法		
公开(公告)号	CN102246036A	公开(公告)日	2011-11-16
申请号	CN200980149846.9	申请日	2009-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	宫崎修 藏下俊祐 田久保耕平		
发明人	宫崎修 藏下俊祐 田久保耕平		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/723 G01N2400/02 G01N2440/38		
代理人(译)	苗堃		
优先权	2008316174 2008-12-11 JP		
其他公开文献	CN102246036B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了含有糖化血红蛋白的试样的前处理方法以及使用该方法的糖化血红蛋白的免疫学测定方法，其处理简便、在保存稳定性以及环境方面不存在问题，并且能够使表位在短时间内充分露出化。一种含有糖化血红蛋白免疫学测定用的糖化血红蛋白的试样的前处理方法，其特征在于，采用含有(A)胍或其盐、与(B)非离子性表面活性剂和/或亚硝酸盐的前处理液，对含有糖化血红蛋白的试样进行处理。

表面活性剂	浓度 (%)	阻碍率 (%)	表面活性剂	浓度 (%)	阻碍率 (%)
水	—	40	聚氧乙烯(23)月桂醇	1	72
聚氧乙烯(23)月桂醇	0.5	76	聚氧乙烯山梨醇酐月桂酸酯(Tween80)	0.5	65
6-D-(N-庚基氨基甲酰基)-α-D-吡喃葡萄糖苷(HECAMEG)	0.25	46	聚氧乙烯壬基苯基醚(Nonidet P40)	0.25	66
n-辛基-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-8)	1	53	聚氧乙烯壬基苯基醚(Triton X-100)	1	71
n-壬基-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-9)	0.5	53	蔗糖月桂酸酯	0.5	74
n-癸基-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-10)	0.25	55	聚氧乙烯壬基苯基醚(Triton X-114)	0.25	65
1-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷	1	72	聚氧乙烯壬基苯基醚(Triton X-114)	1	70
聚氧乙烯(80)聚氧丙烯(30)聚氧乙烯(80)(Pluronic F-68)	0.5	46	n-十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷(DDM)	0.5	71
聚氧乙烯山梨醇酐月桂酸酯(Tween20)	1	79	n-十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷(DDM)	0.25	67
	0.5	72	壬基-β-D-吡喃葡萄糖苷	1	74
	0.25	59	壬基-β-D-吡喃葡萄糖苷	0.5	74
				0.25	51
			皂角苷	1	60
				0.5	48