



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111356920 A

(43)申请公布日 2020.06.30

(21)申请号 201880073243.4

(22)申请日 2018.11.28

(30)优先权数据

2017-231564 2017.12.01 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.05.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/043791 2018.11.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/107414 JA 2019.06.06

(71)申请人 荣研化学株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 安居良太 酒卷望

(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 盛曼 金龙河

(51)Int.Cl.

G01N 33/48(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C07K 14/805(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图10页

(54)发明名称

使血红蛋白与触珠蛋白的复合物稳定的方
法和用于保存含有血红蛋白的样本的保存溶液

(57)摘要

本发明的使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定的方法包括将血红蛋白-触珠蛋白复合物在血红蛋白分解物存在下保存的步骤。根据该方法,能够使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定。

1. 一种使血红蛋白与触珠蛋白的复合物稳定的方法, 其中, 包括将血红蛋白与触珠蛋白的复合物在血红蛋白分解物存在下保存的步骤。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中, 血红蛋白分解物为利用酶得到的血红蛋白分解物。

3. 如权利要求1或2所述的方法, 其中,
包括将血红蛋白与触珠蛋白的复合物在含有血红蛋白分解物的保存溶液中保存的步骤,

血红蛋白分解物在保存溶液中的浓度以铁当量为0.012mg/L以上。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的方法, 其中, 血红蛋白与触珠蛋白的复合物包含通过使含有血红蛋白的样本与触珠蛋白接触而生成的血红蛋白与触珠蛋白的复合物。

5. 如权利要求4所述的方法, 其中, 样本为粪便、唾液或尿。

6. 一种用于保存血红蛋白与触珠蛋白的复合物的保存溶液, 其中, 含有血红蛋白分解物。

7. 一种用于保存含有血红蛋白的样本的保存溶液, 其中, 含有触珠蛋白和血红蛋白分解物。

8. 如权利要求7所述的保存溶液, 其中, 样本为粪便、唾液或尿。

9. 如权利要求6所述的保存溶液, 其中, 进一步含有血红蛋白与触珠蛋白的复合物, 该保存溶液能够作为校准物或对照使用。

10. 如权利要求6~9中任一项所述的保存溶液, 其中, 血红蛋白分解物为利用酶得到的血红蛋白分解物。

11. 如权利要求6~10中任一项所述的保存溶液, 其中, 血红蛋白分解物的浓度以铁当量为0.012mg/L以上。

12. 一种检测样本中的血红蛋白的方法,

其具备:

向权利要求7或8所述的保存溶液中添加样本而得到含有样本的试样的步骤; 以及
通过免疫学方法对试样中的血红蛋白进行检测的步骤,
试样中的血红蛋白与触珠蛋白形成了复合物。

13. 一种用于检测样本中的血红蛋白的试剂盒, 其包含权利要求7或8所述的保存溶液和含有抗血红蛋白抗体的试剂。

使血红蛋白与触珠蛋白的复合物稳定的方法和用于保存含有 血红蛋白的样本的保存溶液

技术领域

[0001] 本发明涉及使血红蛋白与触珠蛋白的复合物稳定的方法、用于保存血红蛋白与触珠蛋白的复合物的保存溶液、用于保存含有血红蛋白的样本的保存溶液、以及用于检测样本中的血红蛋白的方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 粪便、尿、唾液等中所含的血液的检测对大多数疾病的诊断有用。例如，检测粪便中的血液的便潜血检查被用于大肠癌的诊查。作为检测潜血的方法，已知使用抗血红蛋白抗体对粪便等样本中的潜血中所含的血红蛋白进行检测的免疫学方法。供于潜血检查的样本通常从受试者被采集到装有保存溶液的容器中，并被送至医院等检查机构。在大多数情况下，含有样本的保存溶液(试样)要保管数天直到实际供于检查为止，在此期间，经常被置于高温下。血红蛋白在溶液中是不稳定的，在高温条件下特别容易发生变性或分解。由于血红蛋白发生变性或分解而使表位或其周边部位的结构变化时，抗体无法识别血红蛋白，因此，基于免疫学方法的血红蛋白的检测的准确性降低。

[0003] 另外，潜血检查中，基于免疫学方法的血红蛋白浓度的测定中，广泛使用能够迅速且准确地对大量试样进行分析的自动分析装置。一般而言，在利用自动分析装置的测定中，装置的变化和测定中使用的试剂的变化显著影响测定结果，因此，使用包含已知浓度的测定对象物质的校准物或对照，定期地进行自动分析装置的校正或精度管理。自动分析装置的校正通过测定包含浓度已知的测定对象物质的校准物并制作校正曲线来进行，自动分析装置的精度管理通过测定包含已知浓度的测定对象物质的对照并确认测定值是否在规定的范围内来进行。但是，血红蛋白在溶液中是不稳定的，由于校准物或对照中所含的血红蛋白发生变性或分解而使表位或其周边部位的结构变化时，抗体无法识别血红蛋白，无法准确地进行自动分析装置的校正和精度管理，无法进行准确的测定。

[0004] 在这样的背景下，为了使试样中的血红蛋白稳定而提出了多种方法。例如，提出了添加硫柳汞、氯己定等抗菌剂的方法(例如专利文献1)、添加人以外的动物血红蛋白的方法(例如专利文献2)、添加人以外的动物的血清的方法(例如专利文献3)、添加糖苷酶型溶菌酶的方法(例如专利文献4)、添加水溶性过渡金属络合物的方法(例如专利文献5)、添加血红蛋白的酶分解产物的方法(例如专利文献6)、添加亚硫酸或连二亚硫酸等的方法(例如专利文献7)、添加苹果酸等有机酸的方法(例如专利文献8)、添加亚氨基酸的方法(例如专利文献9)、添加乙醛酸的方法(例如专利文献10)、添加卤代烷磺酸的方法(例如专利文献11)等。

[0005] 但是，血红蛋白是非常不稳定的，因此，即使是这些血红蛋白的稳定化方法，也仍不能充分抑制其变性或分解。另一方面，为了使血红蛋白稳定，还已知添加触珠蛋白的方法(例如专利文献12)。触珠蛋白广泛存在于动物的血液中，是担负着回收由于红细胞的溶血而释放到血液中的血红蛋白的作用的蛋白质。已知触珠蛋白与血红蛋白快速地结合而形成

稳定的血红蛋白-触珠蛋白复合物(Hb-Hp复合物)。通过预先向将要加入粪便等样本的保存溶液等中添加触珠蛋白,能够在加入样本时使样本中所含的血红蛋白形成稳定的血红蛋白-触珠蛋白复合物。

- [0006] 现有技术文献
- [0007] 专利文献
- [0008] 专利文献1:日本特开昭63-271160号公报
- [0009] 专利文献2:日本特开平2-296149号公报
- [0010] 专利文献3:日本特开平4-145366号公报
- [0011] 专利文献4:日本特公平5-69466号公报
- [0012] 专利文献5:日本特开平7-229902号公报
- [0013] 专利文献6:日本特开平11-218533号公报
- [0014] 专利文献7:日本特开2000-258420号公报
- [0015] 专利文献8:日本特开2003-14768号公报
- [0016] 专利文献9:日本特开2009-097956号公报
- [0017] 专利文献10:日本特开2013-257216号公报
- [0018] 专利文献11:日本特开2016-191580号公报
- [0019] 专利文献12:日本特开平10-132824号公报

发明内容

[0020] 发明所要解决的问题

[0021] 来源于生物体的样本、特别是粪便中存在大量引起血红蛋白分解的细菌、蛋白水解酶,因此,即使是血红蛋白-触珠蛋白复合物,也有时被分解。因此,本发明的目的在于使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定。

[0022] 用于解决问题的方法

[0023] 本发明的使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定的方法包括将血红蛋白-触珠蛋白复合物在血红蛋白分解物存在下保存的步骤。血红蛋白分解物可以为利用酶得到的血红蛋白分解物。上述方法可以包括将血红蛋白与触珠蛋白的复合物在含有血红蛋白分解物的保存溶液中保存的步骤,血红蛋白分解物在保存溶液中的浓度以铁当量计可以为0.012mg/L以上。血红蛋白与触珠蛋白的复合物可以包含通过使含有血红蛋白的样本与触珠蛋白接触而生成的血红蛋白与触珠蛋白的复合物。样本可以为粪便、唾液或尿,也可以为粪便。

[0024] 本发明的用于保存血红蛋白与触珠蛋白的复合物的保存溶液含有血红蛋白分解物。该保存溶液可以进一步含有血红蛋白与触珠蛋白的复合物,可以作为校准物或对照使用。

[0025] 本发明的用于保存含有血红蛋白的样本的保存溶液含有触珠蛋白和血红蛋白分解物。样本可以为粪便、唾液或尿。

[0026] 血红蛋白分解物可以为利用酶得到的血红蛋白分解物。血红蛋白分解物的浓度以铁当量计可以为0.012mg/L以上。

[0027] 本发明的检测样本中的血红蛋白的方法具备向用于保存含有血红蛋白的样本的上述保存溶液中添加样本而得到含有样本的试样的步骤、以及通过免疫学方法对试样中的

血红蛋白进行检测的步骤,试样中的血红蛋白与触珠蛋白形成了复合物。

[0028] 本发明的用于检测样本中的血红蛋白的试剂盒包含用于保存含有血红蛋白的样本的上述保存溶液和含有抗血红蛋白抗体的试剂。

[0029] 发明效果

[0030] 根据本发明,能够使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定。换言之,根据本发明,能够抑制血红蛋白-触珠蛋白复合物中的血红蛋白的变性和分解。因此,根据本发明,能够以更高的准确性通过免疫学方法对样本中的血红蛋白进行检测。另外,能够提供保存稳定性优良的校准物或对照。

附图说明

[0031] 图1是表示血红蛋白分解物的添加在37℃下给血红蛋白-触珠蛋白复合物的回收率带来的影响的图。

[0032] 图2是表示血红蛋白分解物的添加在56℃下给血红蛋白-触珠蛋白复合物的回收率带来的影响的图。

[0033] 图3是表示血红蛋白分解物的添加在37℃下给血红蛋白的回收率带来的影响的图。

[0034] 图4是表示血红蛋白分解物的添加在56℃下给血红蛋白的回收率带来的影响的图。

[0035] 图5是表示血红蛋白分解物的浓度与粪便中的血红蛋白的回收率的关系的图。

[0036] 图6是表示血红蛋白分解物的浓度与粪便中的血红蛋白的回收率的关系的图。

[0037] 图7是表示添加有触珠蛋白且未添加血红蛋白分解物的情况下的粪便中的血红蛋白的回收率的图。

[0038] 图8是表示添加有触珠蛋白和血红蛋白分解物的情况下的血红蛋白的回收率的图。

[0039] 图9是表示未添加触珠蛋白和血红蛋白分解物的情况下的血红蛋白的回收率的图。

[0040] 图10是表示未添加触珠蛋白且添加有血红蛋白分解物的情况下的血红蛋白的回收率的图。

具体实施方式

[0041] 本发明的使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定的方法包括将血红蛋白-触珠蛋白复合物在血红蛋白分解物存在下保存的步骤。

[0042] 血红蛋白分解物是使血红蛋白形成片段而得到的物质,作为形成片段的方法,可以列举酶分解法、化学分解法等方法。血红蛋白分解物优选为以往使用的利用酶得到的血红蛋白分解物。酶可以为胰蛋白酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶等蛋白水解酶。血红蛋白分解物可以为完全分解后的血红蛋白,也可以为部分分解后的血红蛋白,还可以为它们的混合物。完全分解后的血红蛋白是指在利用酶的分解反应完成时得到的血红蛋白分解物或与其相同的通过化学分解法得到的血红蛋白分解物。部分分解后的血红蛋白是指在利用酶的分解反应完成之前的任意阶段中得到的血红蛋白分解物或与其相同的通过化学分解法得到的

血红蛋白分解物。作为血红蛋白分解物,优选为部分分解后的血红蛋白。即,作为血红蛋白分解物,优选为血红蛋白的酶部分分解物。部分分解后的血红蛋白具有优良的溶解性,并且能够期待珠蛋白片段所带来的、血红蛋白-触珠蛋白复合物的辅助稳定效果。血红蛋白分解物优选包含作为铁与卟啉的络合物的血红素、并且包含被分解至不显示抗原性的程度的珠蛋白。此外,血红蛋白分解物优选被分解至不与触珠蛋白形成复合物的程度。血红蛋白分解物的来源动物没有限定,例如可以为人或具有血红蛋白的人以外的脊椎动物,也可以为猪、牛、马、绵羊、山羊、兔等哺乳类、鸟类、鱼类等。

[0043] 本方法的一个方式包括将血红蛋白-触珠蛋白复合物在含有血红蛋白分解物的保存溶液中保存的步骤。

[0044] 保存溶液可以为含有2-吗啉乙磺酸(MES)、羟乙基哌嗪-2-乙磺酸(HEPES)、哌嗪-双(2-乙磺酸)(PIPES)等Good's缓冲剂的缓冲液,也可以为磷酸缓冲液、Tris缓冲液或甘氨酸缓冲液等。

[0045] 血红蛋白分解物的浓度优选以铁当量为0.012mg/L以上、0.012mg/L~60mg/L、0.12mg/L~12mg/L、1.2mg/L~6.3mg/L或1.2mg/L~3.6mg/L。血红蛋白分解物的浓度以铁当量为60mg/L以下时,保存溶液的粘度不会过高,因此,容易测定试样中的血红蛋白或血红蛋白-触珠蛋白复合物的浓度。另外,血红蛋白分解物的浓度以铁当量为60mg/L以下时,能够抑制血红蛋白分解物所引起的保存溶液的着色。铁当量是指血红蛋白分解物中所含的铁原子的量(mg Fe/L)。血红蛋白分解物的铁当量可以通过邻菲罗啉比色法或原子吸收分光光度法等求出。

[0046] 保存溶液的pH可以为5~10,也可以为6~8。

[0047] 保存溶液中,可以进一步添加叠氮化钠(NaN_3)等抗菌剂、pH调节剂、用于调节离子强度的盐等可在血红蛋白的保存时使用的公知的添加剂。抗菌剂包含抗生素和溶菌酶。添加剂的例子还包含赖氨酸、组氨酸等氨基酸、白蛋白、蛋白水解酶抑制剂、过渡金属离子的水溶性络合物、乙二胺四乙酸(EDTA)等已知具有使血红蛋白稳定的作用的公知成分。白蛋白的例子包含牛血清白蛋白(BSA)等血清白蛋白和来源于蛋白的白蛋白(卵清蛋白)。

[0048] 通过向具有上述组成的保存溶液中进一步添加浓度已知的血红蛋白-触珠蛋白复合物,能够将上述保存溶液作为用于检测或分析血红蛋白-触珠蛋白复合物的校准物或对照使用。这样的校准物或对照中,利用血红蛋白分解物使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定,因此,即使在高温条件下也能够稳定地保存。

[0049] 本方法的更具体的一个方式包括将通过使含有血红蛋白的样本与触珠蛋白接触而生成的血红蛋白-触珠蛋白复合物在上述保存溶液中保存的步骤。含有血红蛋白的样本可以为粪便、唾液或尿。在粪便中存在特别大量的引起血红蛋白分解的细菌、蛋白水解酶,因此,本发明的方法特别有效。

[0050] 含有血红蛋白的样本与触珠蛋白可以以任何方式接触。优选的是,可以在进一步含有触珠蛋白的上述保存溶液中添加含有血红蛋白的样本。样本中的血红蛋白与保存溶液中的触珠蛋白快速地反应而形成血红蛋白-触珠蛋白复合物。于是,通过将样本直接保存于保存溶液中,能够稳定地保存血红蛋白-触珠蛋白复合物。换言之,根据使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定的上述方法,能够在维持血红蛋白-触珠蛋白复合物中的血红蛋白的表位和其周边部位的结构的状态下保存样本。因此,本发明也可以说是提供用于保存含有血红蛋

白的样本的保存溶液。需要说明的是,在血红蛋白与触珠蛋白形成复合物时,血红蛋白从 α 链与 β 链各两个缔合而成的四聚体($\alpha_2\beta_2$)解离为两个二聚体($\alpha\beta$),但该现象不属于本说明书中的“分解”和“变性”。

[0051] 本说明书中,触珠蛋白只要是与血红蛋白复合化而生成血红蛋白-触珠蛋白复合物的触珠蛋白则没有特别限定。血红蛋白与触珠蛋白的结合的生物种特异性低,因此,可以利用来源于广泛的生物种的触珠蛋白。样本中的血红蛋白为人血红蛋白时,可以利用来源于以人以及马、猪、猴、狗、兔、大鼠等动物的触珠蛋白。触珠蛋白未必需要进行高度纯化。

[0052] 本发明的用于保存含有血红蛋白的样本的保存溶液是在含有血红蛋白分解物的上述的保存溶液中进一步添加有触珠蛋白的保存溶液。保存溶液中的触珠蛋白的浓度取决于样本的量,例如为0.05单位/L~50单位/L、0.1单位/L~10单位/L或0.2单位/L~2单位/L。在此,1单位表示与1mg的血红蛋白结合的触珠蛋白量。触珠蛋白浓度优选调节至足以使样本中的全部血红蛋白与触珠蛋白形成复合物的浓度。

[0053] 根据上述的稳定化方法或保存溶液,能够使样本中的血红蛋白以血红蛋白-触珠蛋白复合物的形式稳定。换言之,根据上述的方法或保存溶液,能够抑制样本中的血红蛋白的变性和分解,因此,能够维持血红蛋白的表位和其周边部位的结构。因此,在通过免疫学方法对样本中的血红蛋白进行检测的情况下,可期待检测的准确性提高。

[0054] 本发明提供的检测样本中的血红蛋白的方法具备向用于保存含有血红蛋白的样本的上述保存溶液中添加样本而得到含有样本的试样的步骤、以及通过免疫学方法对试样中的血红蛋白进行检测的步骤。

[0055] 免疫学方法是利用抗血红蛋白抗体的方法,可以使用公知的免疫学方法。免疫学方法例如可以为免疫凝集法(例如,乳胶凝集法或胶体金凝集法)、免疫色谱法或ELISA法。

[0056] 样本中的血红蛋白的检测例如可以以下述方式进行。首先,将样本采集到装有保存溶液的容器中。在样本中存在血红蛋白的情况下,血红蛋白形成血红蛋白-触珠蛋白复合物。不需要样本中的全部血红蛋白都形成复合物,在含有样本的保存溶液(试样)中可以存在未与触珠蛋白形成复合物的血红蛋白,但优选样本中的实质上全部的血红蛋白与触珠蛋白形成了复合物。在容器内将样本保存任意的时间后,将含有样本的保存溶液过滤。接着,通过乳胶凝集法对滤液中的血红蛋白进行检测。更具体而言,将含有表面结合有乳胶粒子的抗血红蛋白抗体的试剂加入到滤液中。抗血红蛋白抗体优选可以识别血红蛋白-触珠蛋白复合物中的血红蛋白的表位、并且不与触珠蛋白发生交叉反应。在滤液中存在血红蛋白的情况下,抗血红蛋白抗体识别血红蛋白,结合于抗体的乳胶粒子发生凝集。对由凝集引起的浊度的变化进行测定,利用使用含有血红蛋白浓度已知的血红蛋白-触珠蛋白复合物的校准物而制成的校正曲线,求出滤液中的血红蛋白浓度。另外,利用基于校准物的血红蛋白-触珠蛋白复合物的浓度制成的校正曲线,也可以求出滤液中的血红蛋白-触珠蛋白复合物的浓度。

[0057] 另外,本发明提供能够用于检测样本中的血红蛋白的试样。试样含有血红蛋白与触珠蛋白的复合物和血红蛋白分解物。更具体而言,试样含有由触珠蛋白和样本中的血红蛋白生成的血红蛋白与触珠蛋白的复合物、和血红蛋白分解物。该试样中,血红蛋白与触珠蛋白的复合物得以稳定,因此,能够以更高的准确性检测样本中的血红蛋白。

[0058] 本发明进一步提供可以在通过上述的方法检测样本中的血红蛋白时使用的试剂

盒。试剂盒包含用于保存含有血红蛋白的样本的上述保存溶液和含有抗血红蛋白抗体的试剂。抗血红蛋白抗体没有限制,可以为多克隆抗体,也可以为单克隆抗体,或者可以为可识别血红蛋白的抗血红蛋白抗体的片段。抗血红蛋白抗体上可以结合有乳胶等检测所需的物质。试剂盒可以进一步包含用于采集样本的器具和容器、用于稀释校准物、对照、样本的溶液等任意的构成。

[0059] [实施例]

[0060] (试验例1-1)

[0061] 制备添加有50mM的HEPES (pH7.4)、0.1%的BSA、0.1%的NaN₃和0~5000mg/L (以铁当量计为0~60mg Fe/L) 的血红蛋白分解物 (Hb分解物) 的保存溶液。作为血红蛋白分解物,使用利用蛋白水解酶得到的来源于猪的血红蛋白分解物 (ILS株式会社制造)。通过SDS-PAGE对血红蛋白分解物进行分析,结果在分子量3kDa~9kDa的位置处观察到宽条带。由铁的含量推定的血红蛋白分解物的平均分子量为4.6kDa。确认血红蛋白分解物被分解至不与触珠蛋白形成复合物的程度后使用。向保存溶液中加入血红蛋白-触珠蛋白复合物 (含有约900μg/L的血红蛋白和约0.9单位/L的触珠蛋白作为构成成分),在4、25、37、45或56℃下保存0、3、7、12和20天。通过乳胶凝集法对保存后的试样中的Hb-Hp复合物的浓度 (μg/L) 进行测定。Hb-Hp复合物的浓度利用Hb-Hp复合物中的血红蛋白的含量来求出。

[0062] Hb-Hp复合物的浓度使用测定试剂“OC-ヘモディア (注册商标) オートS ‘荣研’” (荣研化学株式会社制造) 和测定装置“JCA-BM2250” (日本电子株式会社制造) 来测定。上述测定试剂中含有抗人血红蛋白兔多克隆抗体致敏乳胶粒子。

[0063] JCA-BM2250中的测定条件如下所述。

[0064] 样本量:7.0μL

[0065] 第一试剂:40μL

[0066] 第二试剂:20μL

[0067] 测定波长:658nm

[0068] 由测定的Hb-Hp复合物的浓度,以刚加入Hb-Hp复合物后的Hb-Hp复合物的浓度 (即,加入Hb-Hp复合物起0天后的浓度) 作为基准,算出Hb-Hp复合物的回收率 (%)。将结果示于表1、图1和图2中。表1中,Hb分解物的浓度以铁当量的浓度 (mg Fe/L) 来表示。如这些表和图所示,通过添加Hb分解物,Hb-Hp复合物的回收率得以提高。37℃的保存中20天后的回收率为80%以上 (图1)、56℃的保存中3天后的回收率为50%以上 (图2),即使在高温环境下的保存中也得到了Hb-Hp复合物的高保存稳定性。另外,回收率 (%) 依赖于血红蛋白分解物的添加浓度地提高。由该结果表明,Hb分解物使Hb-Hp复合物得以稳定。需要说明的是,虽然未示出温度为25℃和45℃的情况下的试验结果,但在这些温度下也得到了导出与上述同样的结论的结果。

[0069] [表1]

[0070]

保存温度	Hb分解物的浓度 (mg Fe/L)*	Hb-Hp复合物的浓度 ($\mu\text{g/L}$)**					Hb-Hp复合物的回收率 (%)				
		0天	3天	7天	12天	20天	0天	3天	7天	12天	20天
4°C	0	802	808	800	808	794	100	101	100	101	99
	0.012	835	838	841	848	828	100	100	101	102	99
	0.021	804	800	817	810	793	100	100	102	101	99
	0.12	733	737	742	737	721	100	101	101	101	98
	0.21	771	769	773	783	760	100	100	100	102	99
	0.3	822	822	829	821	815	100	100	101	100	99
	0.525	795	796	791	808	792	100	100	99	102	100
	1.2	794	794	795	799	793	100	100	100	101	100
	2.1	752	749	761	761	745	100	100	101	101	99
	3.6	724	732	740	736	724	100	101	102	102	100
	6.3	684	691	696	697	686	100	101	102	102	100
	12	739	749	749	-	-	100	101	101	-	-
	60	632	629	636	-	-	100	100	101	-	-
37°C	0	802	657	648	610	553	100	82	81	76	69
	0.012	835	773	753	729	688	100	93	90	87	82
	0.021	804	754	745	731	685	100	94	93	91	85
	0.12	733	719	698	698	663	100	98	95	95	90
	0.21	771	749	739	737	697	100	97	96	96	90
	0.3	822	783	786	778	749	100	95	96	95	91
	0.525	795	764	754	749	731	100	96	95	94	92
	1.2	794	763	746	754	731	100	96	94	95	92
	2.1	752	711	719	721	706	100	95	96	96	94
	3.6	724	702	689	692	679	100	97	95	96	94
	6.3	684	678	691	707	696	100	99	101	103	102
	12	739	759	781	-	-	100	103	106	-	-
	60	632	669	691	-	-	100	106	109	-	-
56°C	0	802	353	231	137	57	100	44	29	17	7
	0.012	835	437	289	180	76	100	52	35	22	9
	0.021	804	453	302	188	78	100	56	38	23	10
	0.12	733	513	369	238	101	100	70	50	32	14
	0.21	771	569	418	277	120	100	74	54	36	16
	0.3	822	618	459	305	137	100	75	56	37	17
	0.525	795	614	497	348	170	100	77	63	44	21
	1.2	794	621	536	402	209	100	78	68	51	26
	2.1	752	619	559	449	-	100	82	74	60	-
	3.6	724	588	532	440	271	100	81	73	61	37
	6.3	684	585	559	472	-	100	86	82	69	-
	12	739	733	677	-	-	100	99	92	-	-
	60	632	655	617	-	-	100	104	98	-	-

[0071] *:铁当量的浓度

[0072] **:Hb-Hp复合物中的血红蛋白的含量

[0073] 表中的-表示未进行测定。

[0074] (试验例1-2)

[0075] 作为参考,向保存溶液中添加血红蛋白来代替Hb-Hp复合物,进行与试验例1-1同样的试验。将计算血红蛋白的回收率(%)而得到的结果示于表2、图3和图4中。如这些表和图所示,通过添加Hb分解物,血红蛋白的回收率得以提高,但同与触珠蛋白形成了复合物的血红蛋白(试验例1-1)相比,回收率低。在37°C的保存中20天后的回收率最大为35%(图3)、

在56℃的保存中3天后的回收率为2%以下(图4),高温环境下的保存中的血红蛋白的保存稳定性显著低。

[0076] [表2]

保存温度	Hb分解物的浓度 (mg Fe/L)*	血红蛋白的浓度 (μg/L)					血红蛋白的回收率 (%)				
		0天	3天	7天	12天	20天	0天	3天	7天	12天	20天
4℃	0	957	944	930	931	886	100	99	97	97	93
	0.012	965	953	942	952	935	100	99	98	99	97
	0.021	954	933	930	936	910	100	98	97	98	95
	0.12	924	915	919	922	901	100	99	99	100	98
	0.21	955	959	936	933	923	100	100	98	98	97
	0.3	959	940	942	953	934	100	98	98	99	97
	0.525	923	904	898	900	882	100	98	97	98	96
	1.2	957	931	941	940	929	100	97	98	98	97
	2.1	871	861	853	852	832	100	99	98	98	96
	3.6	898	896	883	898	864	100	100	98	100	96
	6.3	742	732	729	703	667	100	99	98	95	90
37℃	0	957	458	329	229	93	100	48	34	24	10
	0.012	965	660	491	360	186	100	68	51	37	19
	0.021	954	697	540	405	218	100	73	57	42	23
	0.12	924	786	678	545	321	100	85	73	59	35
	0.21	955	798	656	521	318	100	84	69	55	33
	0.3	959	840	675	541	323	100	88	70	56	34
	0.525	923	703	524	382	198	100	76	57	41	21
	1.2	957	697	474	304	124	100	73	50	32	13
	2.1	871	391	163	80	54	100	45	19	9	6
	3.6	898	458	194	80	50	100	51	22	9	6
	6.3	742	161	123	112	100	100	22	17	15	13
56℃	0	957	2	0	0	0	100	0	0	0	0
	0.012	965	6	0	0	0	100	1	0	0	0
	0.021	954	7	3	0	0	100	1	0	0	0
	0.12	924	7	3	1	1	100	1	0	0	0
	0.21	955	8	3	1	1	100	1	0	0	0
	0.3	959	7	2	2	0	100	1	0	0	0
	0.525	923	5	2	1	0	100	1	0	0	0
	1.2	957	6	2	2	0	100	1	0	0	0
	2.1	871	6	0	1	0	100	1	0	0	0
	3.6	898	7	4	4	-2	100	1	0	0	0
	6.3	742	12	7	7	2	100	2	1	1	0

[0078] *:铁当量的浓度

[0079] (试验例2-1)

[0080] 制备添加有50mM的HEPES (pH6.8)、0.1%的BSA、0.1%的NaN₃、0~1000mg/L (以铁当量计为0~12mg Fe/L) 的血红蛋白分解物 (ILS株式会社制造) 和1单位/L的触珠蛋白的保存溶液。将添加有血红蛋白的粪便样本以使粪便浓度为0.5质量%的方式加入到保存溶液中,在37℃下保存0、7和14天。通过乳胶凝集法对保存后的试样中的血红蛋白的浓度 (μg/L) 进行测定。需要说明的是,粪便样本中添加有使试样中的血红蛋白浓度为约500μg/L的量的血红蛋白。

[0081] 血红蛋白的浓度使用测定试剂“OC-ヘモディア (注册商标) オートIII ‘荣研’ ” (荣研化学株式会社制造) 和测定装置“OCセンサーDIANA” (荣研化学株式会社制造) 来测定。上述测定试剂中含有抗人血红蛋白兔多克隆抗体致敏乳胶粒子。

[0082] 由测定的血红蛋白的浓度,以将粪便样本刚加入到保存溶液后的血红蛋白的浓度

(即,加入粪便样本起0天后的浓度)作为基准,算出粪便试样中的血红蛋白的回收率(%)。将结果示于表3、图5和图6中。图5、图6分别示出粪便试样1、粪便试样2的结果。表3中,Hb分解物的浓度以铁当量的浓度(mg Fe/L)来表示。如这些表和图所示,对于粪便1、粪便2中的任一粪便试样而言,通过添加Hb分解物,试样中的血红蛋白的回收率都呈浓度依赖性地提高。由该结果表明,Hb分解物使血红蛋白得以稳定。需要说明的是,试样中的血红蛋白以与保存溶液中含有的触珠蛋白结合的Hb-Hp复合物的状态存在,因此,上述的结果意味着,Hb分解物使Hb-Hp复合物得以稳定。

[0083] [表3]

保存温度	Hb分解物的浓度 (mg Fe/L)*	血红蛋白的浓度 ($\mu\text{g/L}$)					
		粪便 1			粪便 2		
		0 天	7 天	14 天	0 天	7 天	14 天
37°C	0.012	512	356	303	527	357	279
	0.12	512	376	340	548	409	334
	1.2	488	388	372	520	450	385
	3.6	486	401	382	489	439	407
	12	413	372	386	440	432	414
保存温度	Hb分解物的浓度 (mg Fe/L)*	血红蛋白的回收率 (%)					
		粪便 1			粪便 2		
		0 天	7 天	14 天	0 天	7 天	14 天
37°C	0.012	100	70	59	100	68	53
	0.12	100	73	66	100	75	61
	1.2	100	80	76	100	87	74
	3.6	100	83	79	100	90	83
	12	100	90	93	100	98	94

[0085] *:铁当量的浓度

[0086] (试验例2-2)

[0087] 将添加到保存溶液中的血红蛋白分解物的浓度固定为300mg/L(以铁当量计为3.6mg Fe/L),与试验例2-1同样地进行试验。另外,作为比较例,在保存溶液中不添加血红蛋白分解物的条件下,进行同样的试验。将结果示于表4、图7和8中。图7、图8分别示出未添加血红蛋白分解物的例子、添加有血红蛋白分解物的例子的结果。如这些表和图所示,通过添加Hb分解物,试样中的血红蛋白的回收率得以提高。由该结果表明,Hb分解物使血红蛋白得以稳定。需要说明的是,试样中的血红蛋白以与保存溶液中含有的触珠蛋白结合的Hb-Hp复合物的状态存在,因此,上述的结果意味着,Hb分解物使Hb-Hp复合物得以稳定。

[0088] [表4]

[0089]

	保存 温度	血红蛋白的浓度 ($\mu\text{g/L}$)					
		Hb分解物: 未添加			Hb分解物: 添加		
		0 天	7 天	14 天	0 天	7 天	14 天
粪便 1	37°C	514	348	276	482	405	374
粪便 2		527	296	225	490	435	383
粪便 3		487	404	362	495	469	442
粪便 4		474	301	267	493	374	367
粪便 5		485	407	366	505	502	485
粪便 6		500	410	345	512	503	467
粪便 7		480	430	366	501	488	455
粪便 8		487	361	302	511	496	446
	保存 温度	血红蛋白的回收率 (%)					
		Hb分解物: 未添加			Hb分解物: 添加		
		0 天	7 天	14 天	0 天	7 天	14 天
粪便 1	37°C	100	68	54	100	84	78
粪便 2		100	56	43	100	89	78
粪便 3		100	83	74	100	95	89
粪便 4		100	63	56	100	76	74
粪便 5		100	84	75	100	99	96
粪便 6		100	82	69	100	98	91
粪便 7		100	90	76	100	97	91
粪便 8		100	74	62	100	97	87

[0090] (试验例2-3)

[0091] 作为参考,在保存溶液中不添加触珠蛋白的条件下,进行与试验例2-2同样的试验。将结果示于表5、图9和图10中。图9、图10分别示出未添加血红蛋白分解物的例子、添加有血红蛋白分解物的例子的结果。如这些表和图所示,同与触珠蛋白形成了复合物的血红蛋白(试验例2-2)相比,血红蛋白的回收率低。

[0092] [表5]

[0093]

	保存 温度	血红蛋白的浓度 ($\mu\text{g/L}$)							
		Hb分解物: 未添加				Hb分解物: 添加			
		0天	1天	3天	7天	0天	1天	3天	7天
粪便 1	37°C	489	263	82	1	479	279	55	9
粪便 2		517	175	13	0	489	229	29	8
粪便 3		528	283	102	2	510	284	83	6
粪便 4		535	153	7	0	519	177	27	11
粪便 5		529	334	170	8	525	347	136	8
粪便 6		529	254	73	5	518	291	53	9
粪便 7		498	241	86	8	509	359	182	7
粪便 8		528	239	60	1	512	256	59	6
	保存 温度	血红蛋白的回收率 (%)							
		Hb分解物: 未添加				Hb分解物: 添加			
		0天	1天	3天	7天	0天	1天	3天	7天
粪便 1	37°C	100	54	17	0	100	58	11	2
粪便 2		100	34	3	0	100	47	6	2
粪便 3		100	54	19	0	100	56	16	1
粪便 4		100	29	1	0	100	34	5	2
粪便 5		100	63	32	1	100	66	26	2
粪便 6		100	48	14	1	100	56	10	2
粪便 7		100	48	17	2	100	71	36	1
粪便 8		100	45	11	0	100	50	12	1

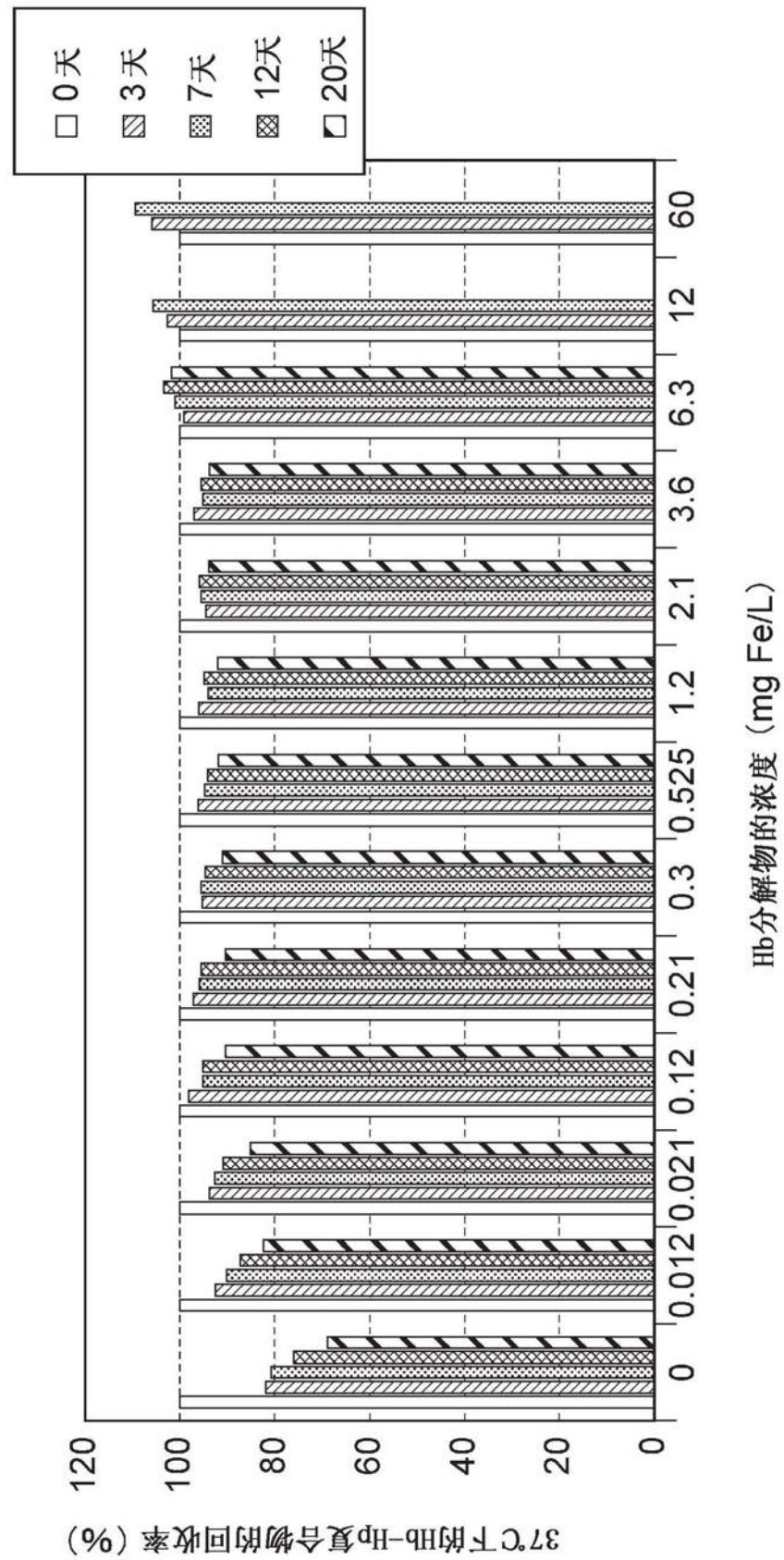


图1

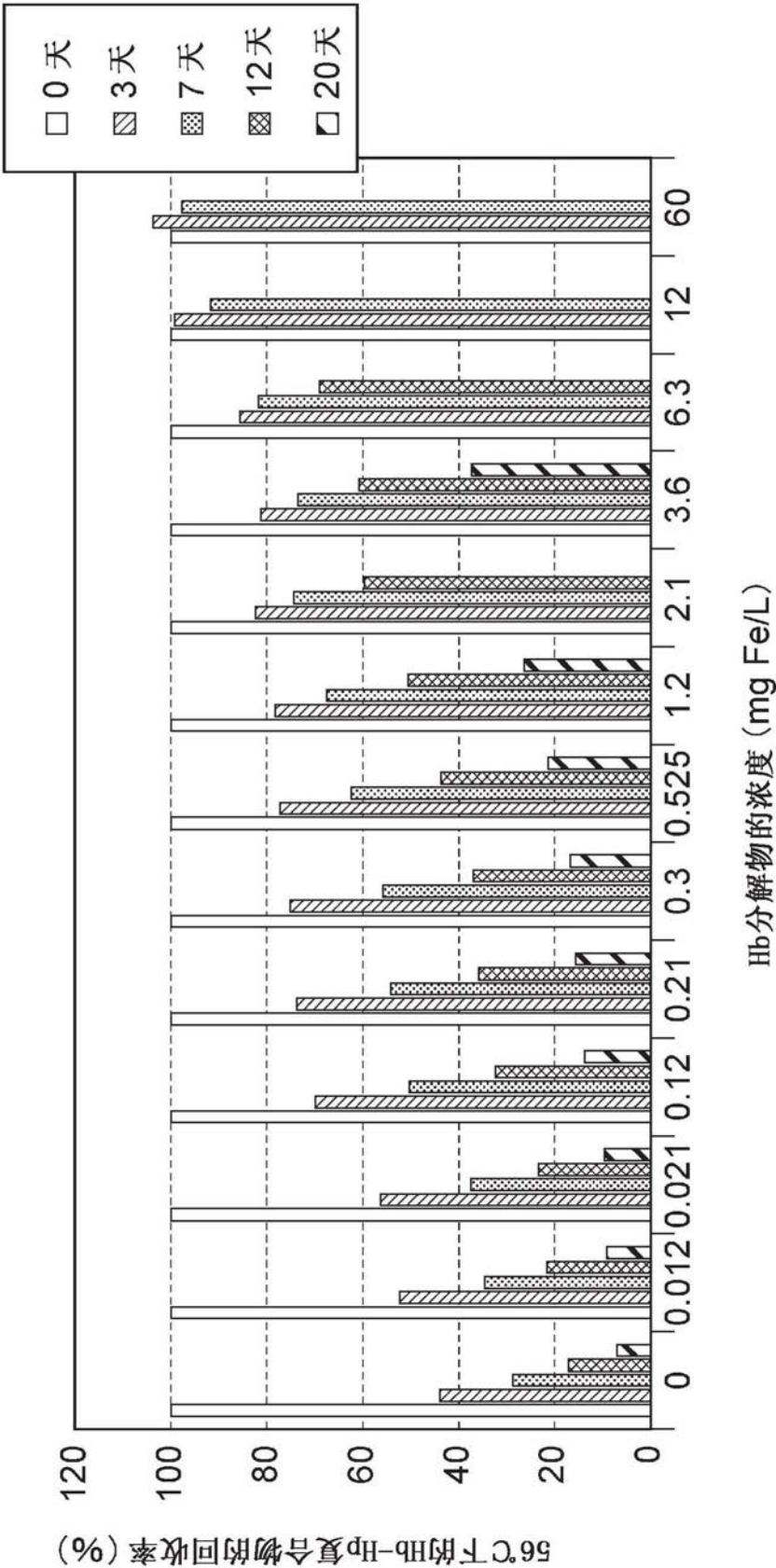


图2

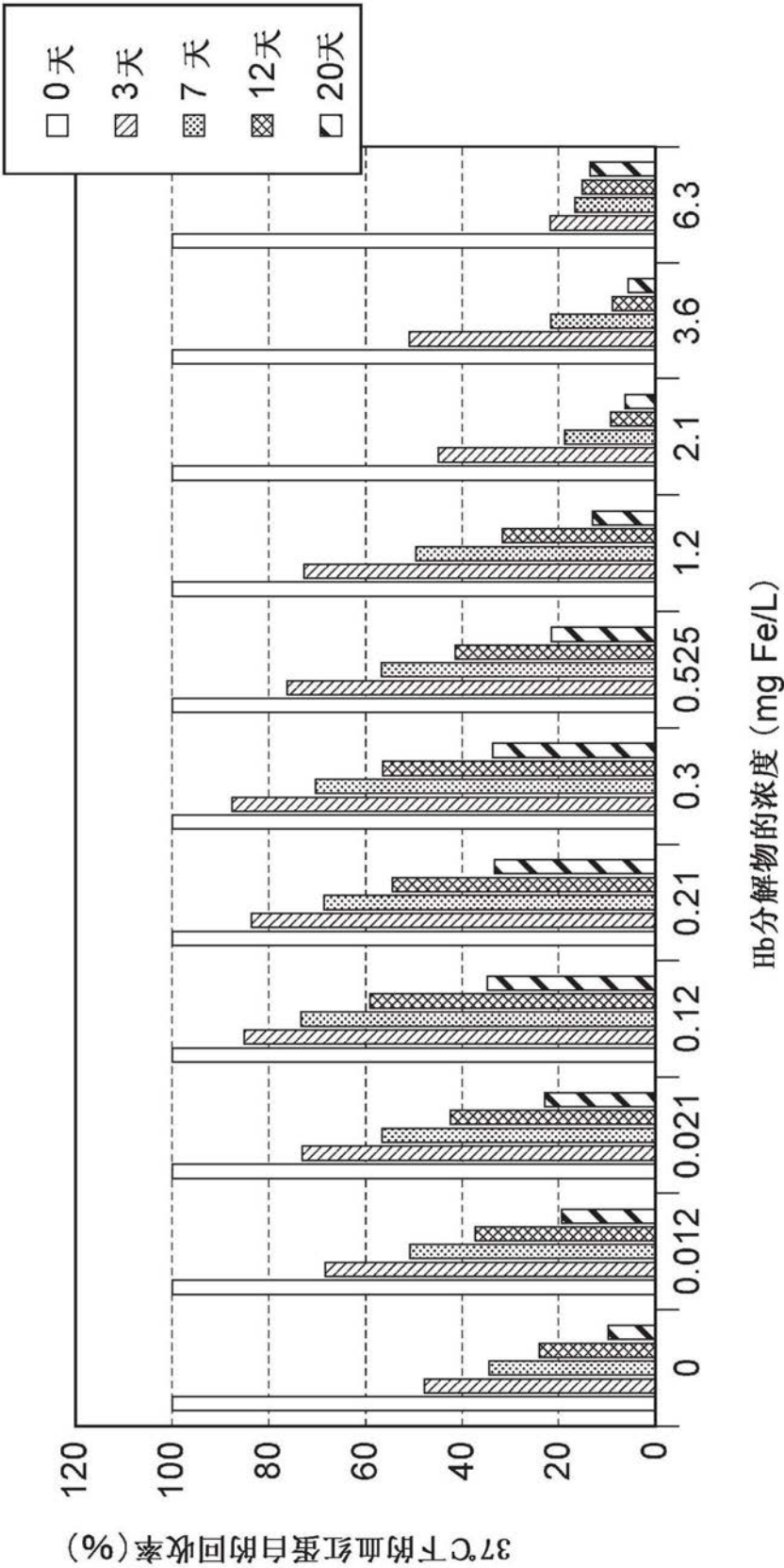


图3

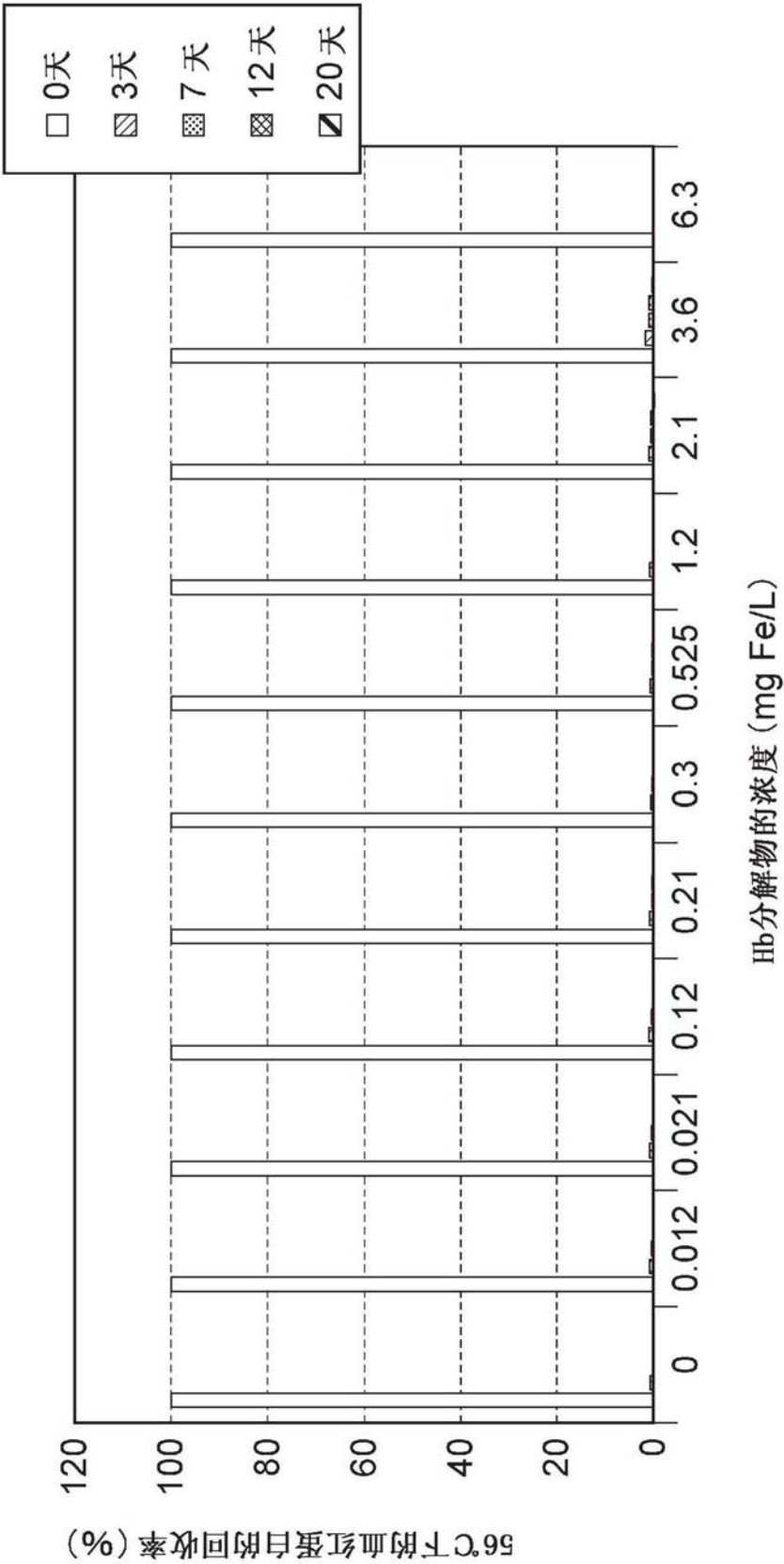


图4

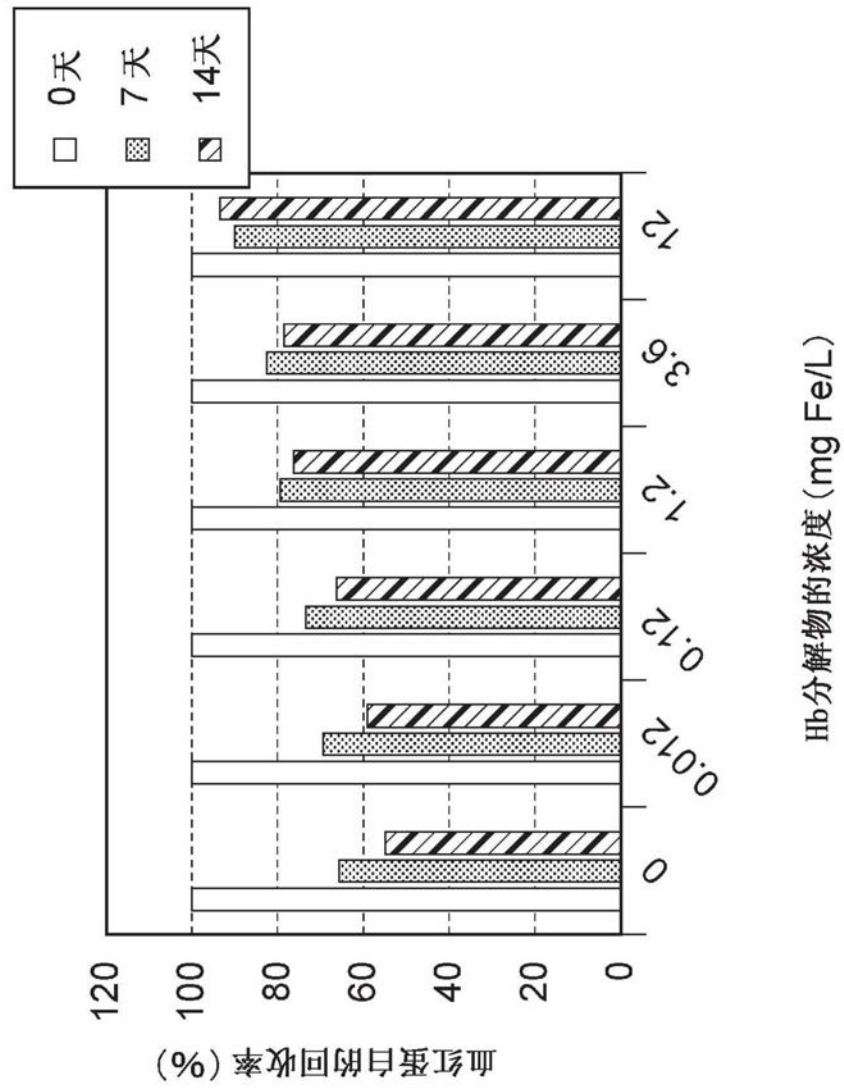


图5

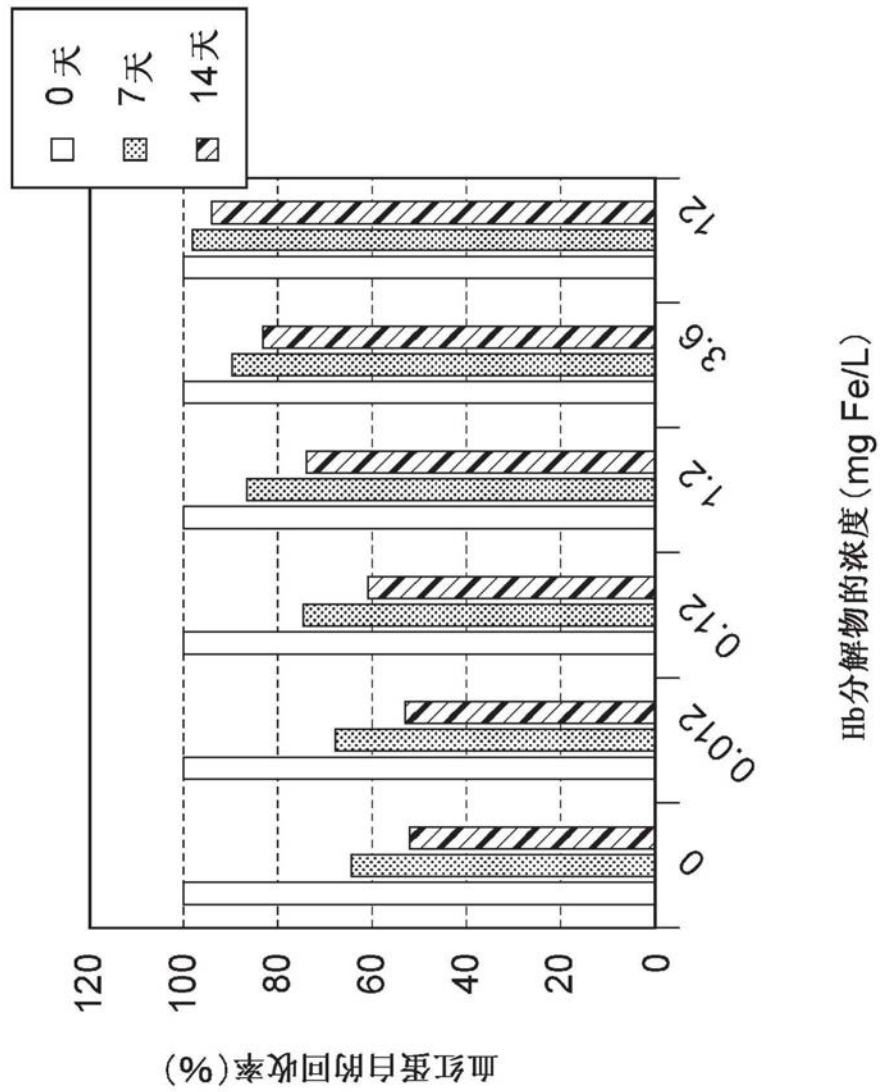


图6

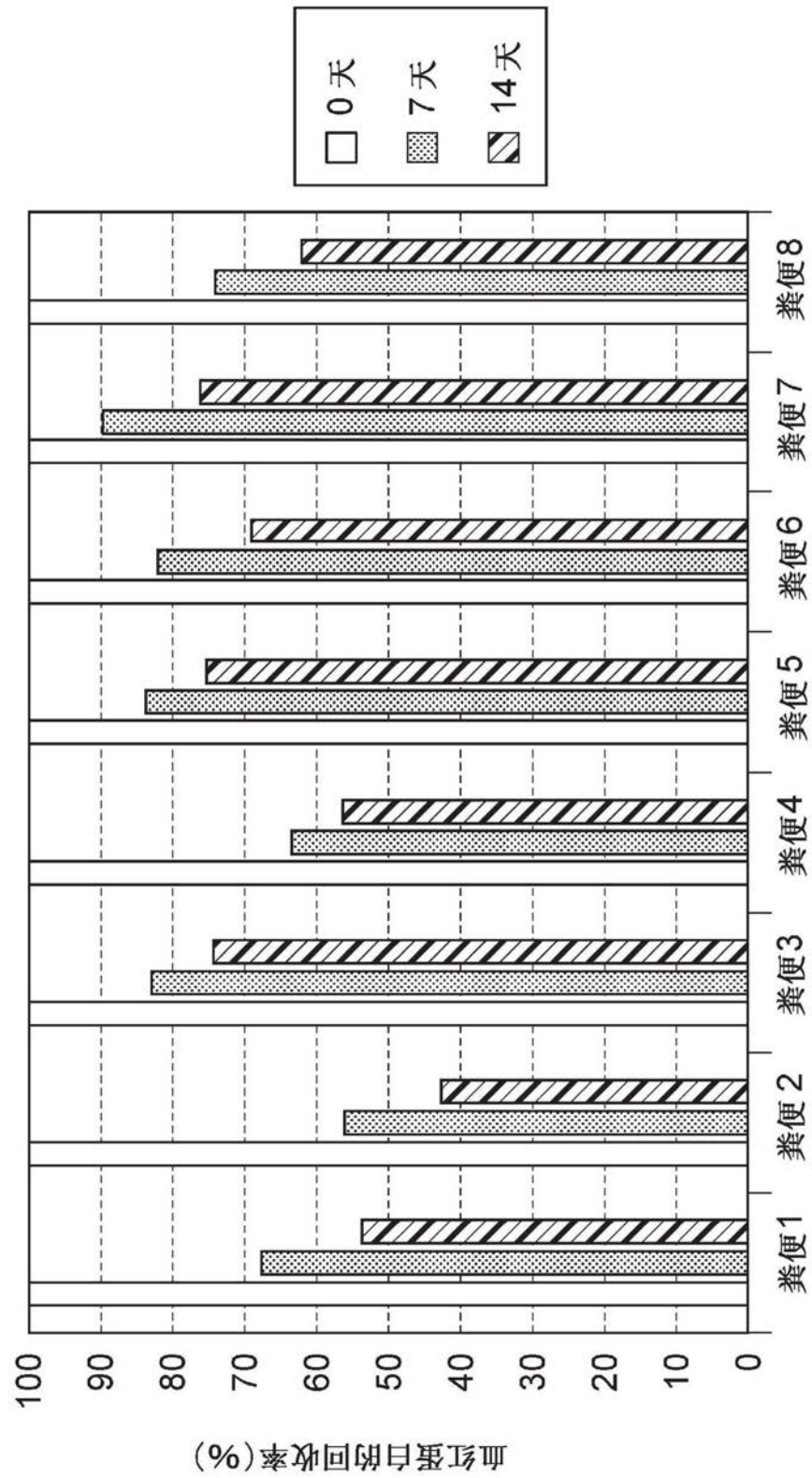


图7

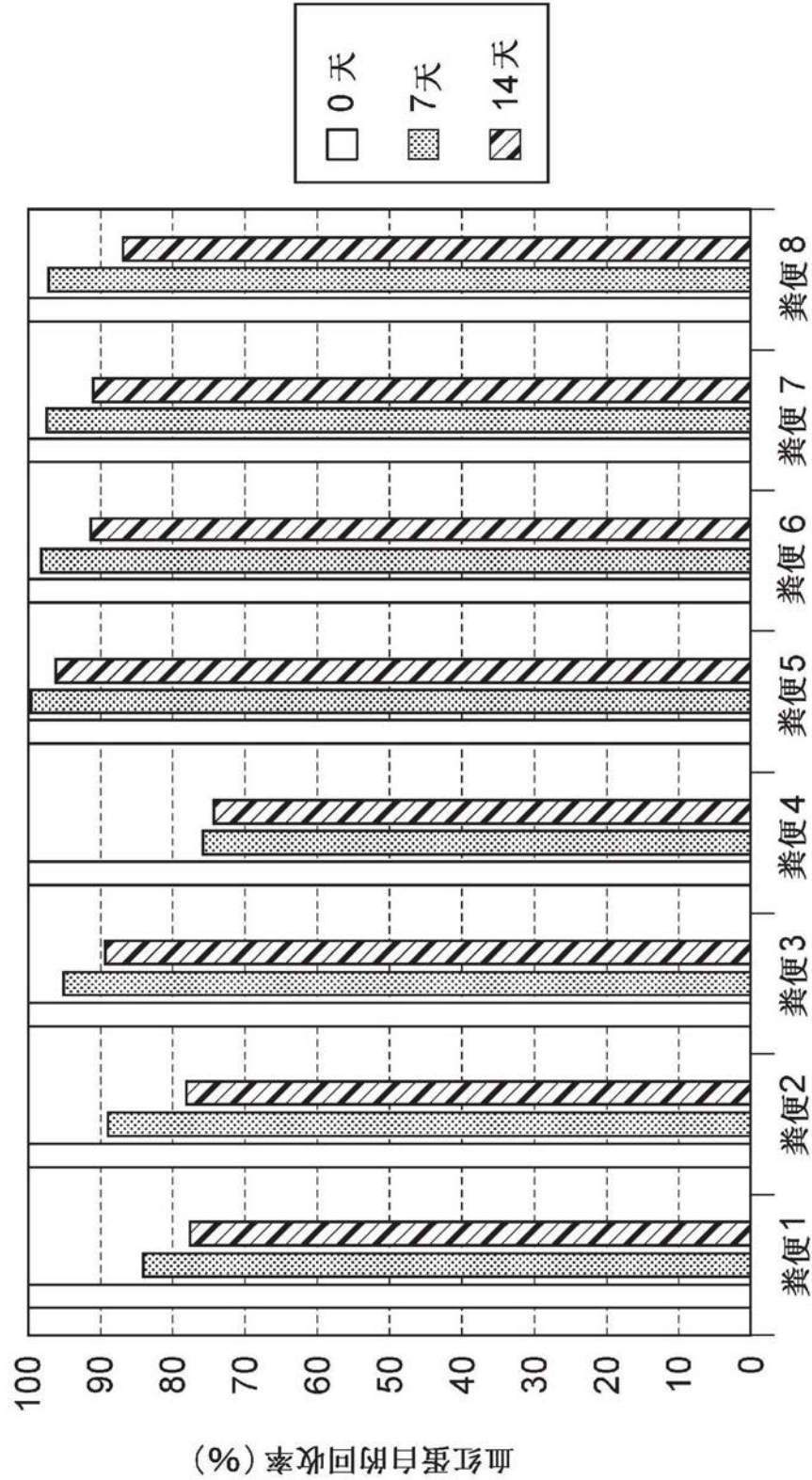


图8

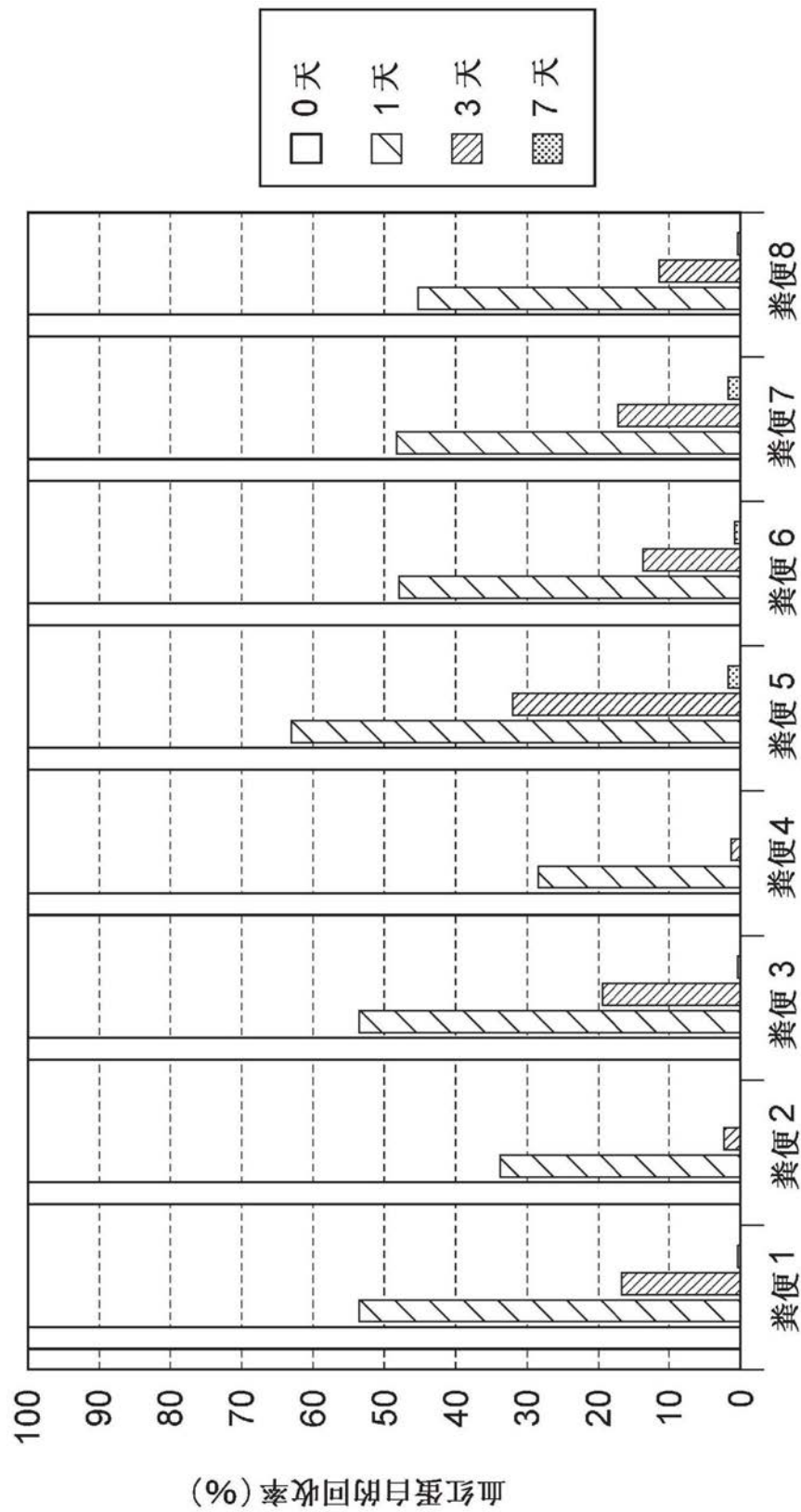


图9

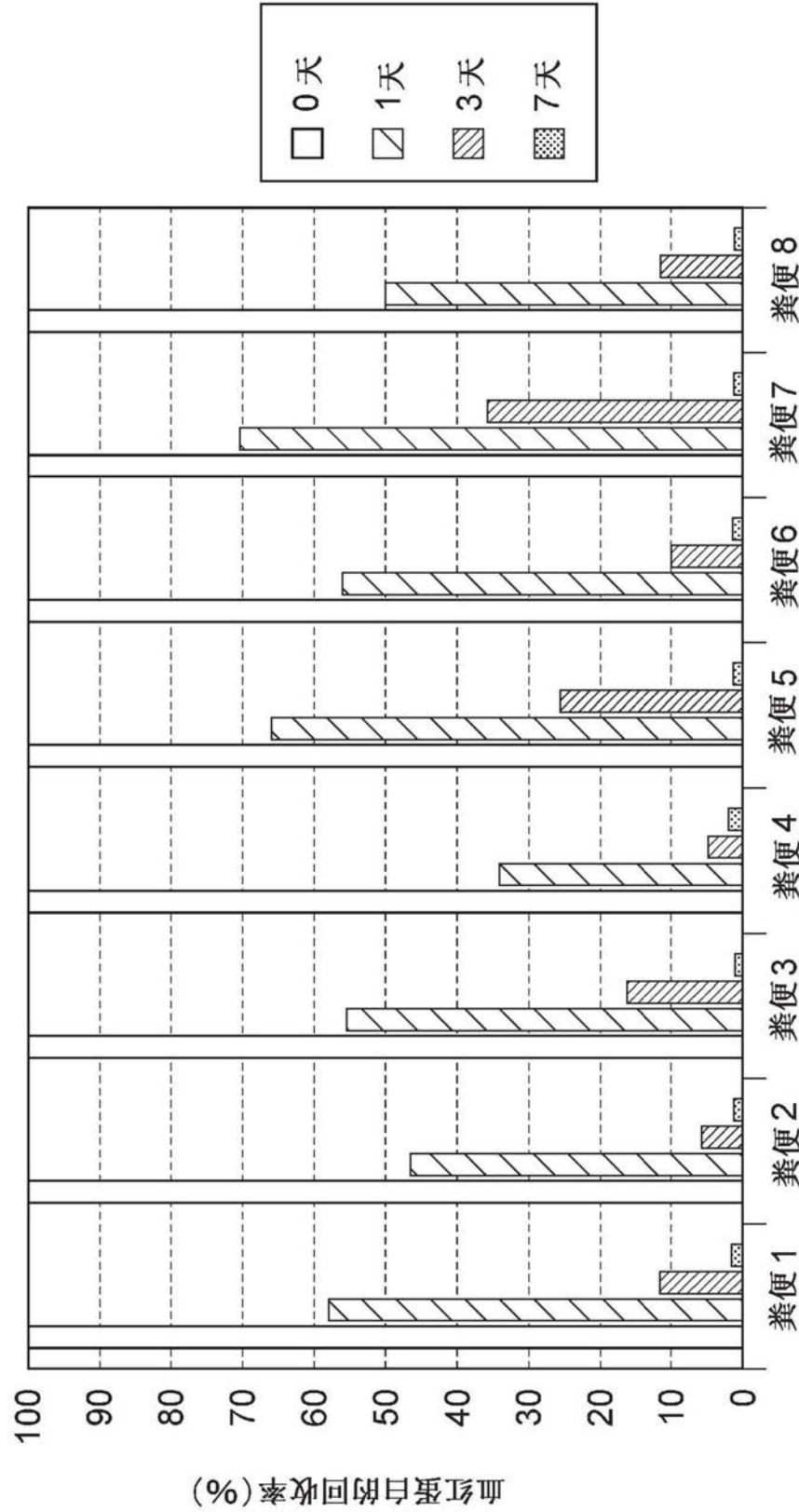


图10

专利名称(译)	使血红蛋白与触珠蛋白的复合物稳定的方法和用于保存含有血红蛋白的样本的保存溶液		
公开(公告)号	CN111356920A	公开(公告)日	2020-06-30
申请号	CN201880073243.4	申请日	2018-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
[标]发明人	安居良太		
发明人	安居良太 酒卷望		
IPC分类号	G01N33/48 C12M1/34 G01N33/50 G01N33/53 C07K14/805		
CPC分类号	C07K14/805 C12M1/34 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53		
代理人(译)	盛曼		
优先权	2017231564 2017-12-01 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定的方法包括将血红蛋白-触珠蛋白复合物在血红蛋白分解物存在下保存的步骤。根据该方法，能够使血红蛋白-触珠蛋白复合物稳定。

保存温度	Hb分解物的浓度 (mg Fe/L)*	Hb-Hp复合物的浓度 (μg/L)**					Hb-Hp复合物的回收率 (%)				
		0 天	3 天	7 天	12 天	20 天	0 天	3 天	7 天	12 天	20 天
4℃	0	802	808	800	808	794	100	101	100	101	99
	0.012	835	838	841	848	828	100	100	101	102	99
	0.021	804	800	817	810	793	100	100	102	101	99
	0.12	733	737	742	737	721	100	101	101	101	98
	0.21	771	769	773	785	760	100	100	100	102	99
	0.3	822	822	829	821	815	100	100	101	100	99
	0.525	795	796	791	808	792	100	100	99	102	100
	1.2	794	794	795	799	793	100	100	100	101	100
	2.1	752	749	761	761	745	100	100	101	101	99
	3.6	724	732	740	736	724	100	101	102	102	100
	6.3	684	691	696	697	686	100	101	102	102	100
	12	739	749	746	—	—	100	101	101	—	—
	60	632	629	636	—	—	100	100	101	—	—
37℃	0	802	857	848	810	853	100	82	81	76	69
	0.012	835	773	753	729	688	100	93	90	87	82
	0.021	804	754	745	731	685	100	94	93	91	85
	0.12	733	719	698	698	663	100	98	95	95	90
	0.21	771	749	739	737	697	100	97	96	96	90
	0.3	822	783	786	778	740	100	95	96	95	91
	0.525	795	764	754	749	731	100	96	95	94	92
	1.2	794	763	746	754	731	100	96	94	95	92
	2.1	752	711	719	721	706	100	95	96	96	94
	3.6	724	702	689	692	679	100	97	95	96	94
	6.3	684	676	691	707	696	100	99	101	103	102
	12	739	759	781	—	—	100	103	106	—	—
	60	632	669	691	—	—	100	106	109	—	—
56℃	0	802	353	231	137	57	100	44	29	17	7
	0.012	835	437	289	180	76	100	52	35	22	9
	0.021	804	453	302	188	78	100	56	38	23	10
	0.12	733	513	369	238	101	100	70	50	32	14
	0.21	771	569	418	277	120	100	74	54	36	15
	0.3	822	616	459	305	137	100	75	56	37	17
	0.525	795	614	497	348	170	100	77	63	44	21
	1.2	794	621	536	402	209	100	78	68	51	26
	2.1	752	619	559	449	—	100	82	74	60	—
	3.6	724	588	532	440	271	100	81	73	61	37
	6.3	684	585	559	472	—	100	86	82	69	—
	12	739	733	677	—	—	100	99	92	—	—
	60	632	655	617	—	—	100	104	98	—	—