



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107615069 B

(45) 授权公告日 2021.04.20

(21) 申请号 201680030211.7

(72) 发明人 坂田梢 谷合伸 安居良太

(22) 申请日 2016.03.31

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107615069 A

代理人 王玮玮 郑霞

(43) 申请公布日 2018.01.19

(51) Int.CI.

G01N 33/531 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 14/805 (2006.01)

2015-070667 2015.03.31 JP

G01N 1/28 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.24

(56) 对比文件

US 2008019871 A1, 2008.01.24

(86) PCT国际申请的申请数据

US 6376169 B1, 2002.04.23

PCT/JP2016/060597 2016.03.31

US 2011046052 A1, 2011.02.24

(87) PCT国际申请的公布数据

US 7354732 B2, 2008.04.08

W02016/159203 JA 2016.10.06

审查员 舒霏霏

(73) 专利权人 荣研化学株式会社

权利要求书1页 说明书10页

地址 日本东京都

(54) 发明名称

血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法

(57) 摘要

本发明的目的在于提供一种有效阻止血红素蛋白变性或降解的新的血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法,具体涉及含有二磷酸或其盐的血红素蛋白保存液以及使二磷酸或其盐共存于含血红素蛋白的样品中的血红素蛋白稳定化方法。

1. 一种血红素蛋白用保存液, 其含有二磺酸或其盐, 其中, 所述二磺酸或其盐为至少一种选自由以下组成的组中的二磺酸或其盐: 1,2-乙二磺酸、丙二磺酸、丁二磺酸、1,2-苯二磺酸、1,3-苯二磺酸、1,4-苯二磺酸、1,6-萘二磺酸、2,6-萘二磺酸、2,7-萘二磺酸, 或其盐, 并且所述二磺酸或其盐的浓度为0.001mol/L以上且0.3mol/L以下。

2. 根据权利要求1所述的血红素蛋白用保存液, 其还含有N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-乙磺酸。

3. 根据权利要求1或2所述的血红素蛋白用保存液, 其还含有用作标准样品或对照样品的血红素蛋白。

4. 根据权利要求1或2所述的血红素蛋白用保存液, 其用于免疫测定。

5. 根据权利要求3所述的血红素蛋白用保存液, 其用于免疫测定。

6. 一种血红素蛋白稳定化方法, 其中, 使二磺酸或其盐共存于含血红素蛋白的样品中, 所述二磺酸或其盐为选自由以下组成的组中的二磺酸或其盐: 1,2-乙二磺酸、丙二磺酸、丁二磺酸、1,2-苯二磺酸、1,3-苯二磺酸、1,4-苯二磺酸、1,6-萘二磺酸、2,6-萘二磺酸、2,7-萘二磺酸, 或其盐, 并且所述二磺酸或其盐的浓度为0.001mol/L以上且0.3mol/L以下。

7. 一种血红素蛋白的免疫测定方法, 其包括以下步骤: 在二磺酸或其盐的存在下, 使血红素蛋白与抗血红素蛋白抗体接触,

其中, 所述二磺酸或其盐为至少一种选自由以下组成的组中的二磺酸或其盐: 1,2-乙二磺酸、丙二磺酸、丁二磺酸、1,2-苯二磺酸、1,3-苯二磺酸、1,4-苯二磺酸、1,6-萘二磺酸、2,6-萘二磺酸、2,7-萘二磺酸, 或其盐, 并且所述二磺酸或其盐的浓度为0.001mol/L以上且0.3mol/L以下。

## 血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及血红素蛋白(ヘムタンパク質)保存液和血红素蛋白稳定化方法。尤其涉及在免疫测定法中有用的血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,随着癌症发病率不断增加,作为大肠癌体检的初次检查和下消化道疾病的筛查法,检测粪便中血液的便潜血检查也广泛开展。便潜血检查通过基于利用作为血红素蛋白的血红蛋白(ヘモグロビン)所具有的过氧化物酶活性的化学显色反应的化学测定法和利用对人血红蛋白有特异性的抗体的免疫测定法来进行,尤其是,免疫测定法与化学测定法相比,无需在检查前限制进餐和限制服药,可简便快速地进行测定,因此是公认的便潜血检查的主要检查方法。

[0003] 但是,已知血红蛋白在溶液中非常不稳定,容易变性或降解。这种变性或降解,使血红蛋白的立体结构遭到破坏,其抗原性降低,因此在血红蛋白的免疫测定法中会导致错误的测定结果。作为血红蛋白变性或降解的原因,列举有保存温度上升、时间推移、细菌及酶等各种因素,例如,关于保存温度,已知溶液中的血红蛋白在冷冻或冷藏状态下较为稳定,但在室温或室温以上的温度下会发生变性或降解。

[0004] 尤其是,在便潜血检查中,多为受试者自己在自家等采集粪便,在含有粪便检体用稀释液的密闭容器中将粪便悬浮用于检查,这种情况下,粪便中的血红蛋白可能会在溶液中放置数日,因利用邮递等运送方式而置于高温下。而且,在医院和检查机构会进行多个检体和其他项目的检查,因此在得出测定结果前可能需要很长时间。因此,在便潜血检查中,温度上升和时间推移等原因相互叠加,导致血红蛋白容易发生变性或降解。

[0005] 而且,在便潜血检查中,经常使用能够准确且快速地测定多个检体的自动分析装置进行测定。使用自动分析装置的测定中,试剂和装置的变化会影响检查结果的精度,因此使用含有已知血红蛋白浓度的标准样品和含有已知血红蛋白浓度的对照样品定期进行自动分析装置的校准和精度管理。关于校准,是通过自动分析装置测定含有多种已知浓度的测定对象物质的标准试剂,绘制标准曲线,进行自动分析装置的校准;关于精度管理,是通过自动分析装置测定含有已知测定对象物质浓度的对照试剂,根据测定值是否处于规定范围内来判定分析精度。但是,如果标准试剂和对照试剂中所含有的血红蛋白发生变性或降解,则无法准确地进行校准和精度管理,导致测定出现错误。

[0006] 因此,为了抑制血红蛋白变性或降解,得到准确的测定结果,至今提出有各种用于使血红蛋白稳定的方法。例如,提出有添加硫柳汞和双氯苯双胍己烷等抗微生物剂的方法(例如参考专利文献1)、添加除人以外的动物血红蛋白的方法(例如参考专利文献2)、添加除人以外的动物血清的方法(例如参考专利文献3)、添加糖苷酶型溶菌酶的方法(例如参考专利文献4)、添加亚硫酸及二亚硫酸等的方法(例如参考专利文献5)、添加酰基精氨酸酯和阳离子型表面活性剂的方法(例如参考专利文献6)、添加乙醛酸的方法(例如参考专利文献7)等。

[0007] 而且,本申请人已经提出了添加亚铁氰化物等水溶性过渡金属配合物的方法(例如参考专利文献8、专利文献9)、添加血红蛋白酶解产物的方法(例如参考专利文献10)、添加过渡金属类的方法(例如参考专利文献11)、添加苹果酸等有机酸的方法(例如参考专利文献12)、添加脱脂白蛋白的方法(例如参考专利文献13)、添加亚氨基羧酸的方法(例如参考专利文献14)等。

[0008] 但是,由于血红蛋白非常不稳定,因此即使是这些血红蛋白稳定化方法,也存在无法充分防止其变性或降解的问题。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本特开昭63-271160号公报

[0012] 专利文献2:日本特开平2-296149号公报

[0013] 专利文献3:日本特开平4-145366号公报

[0014] 专利文献4:日本特公平5-69466号公报

[0015] 专利文献5:日本特开2000-258420号公报

[0016] 专利文献6:日本特开2009-222710号公报

[0017] 专利文献7:日本特开2013-257216号公报

[0018] 专利文献8:日本特开平7-229902号公报

[0019] 专利文献9:日本特开平11-118806号公报

[0020] 专利文献10:日本特开平11-218533号公报

[0021] 专利文献11:日本特开2001-249132号公报

[0022] 专利文献12:日本特开2003-14768号公报

[0023] 专利文献13:日本特开2003-194825号公报

[0024] 专利文献14:日本特开2009-097956号公报

## 发明内容

[0025] 发明所要解决的问题

[0026] 为了解决上述问题,本发明的目的在于提供有效阻止以血红蛋白为代表的血红素蛋白变性或降解的新的血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法。

[0027] 解决问题的技术手段

[0028] 本发明的血红素蛋白保存液,其特征在于,含有二磺酸或其盐。另外,本发明的血红素蛋白稳定化方法,其特征在于,使二磺酸或其盐共存于含血红素蛋白的样品中。

[0029] 即,本发明包含如下内容。

[0030] (1)一种血红素蛋白保存液,其含有二磺酸或其盐。

[0031] (2)根据(1)所述的血红素蛋白保存液,其中,二磺酸或其盐为具有至少一个链式烃基或环式烃基的二磺酸或其盐,且为至少一种选自由以下组成的组中的二磺酸或其盐:

[0032] 所述链式烃基为支链状或直链状烃基,且支链状的所述链式烃基的主链或者直链状的所述链式烃基中的碳原子数为1~10中任意数的二磺酸或其盐;

[0033] 所述环式烃基为环亚烷基或芳基,且所述环式烃基中的碳原子数为3~10中任意数的二磺酸或其盐;以及

[0034] 所述环亚烷基或所述芳基具有1个以上取代的氮原子的二磺酸或其盐。

[0035] (3)根据(1)或(2)所述的血红素蛋白保存液,其中,二磺酸或其盐为至少一种选自由以下组成的组中的二磺酸或其盐:甲二磺酸、乙二磺酸、丙二磺酸、丁二磺酸、萘二磺酸、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)或其盐。

[0036] (4)根据(1)~(3)中任一项所述的血红素蛋白保存液,其中,二磺酸或其盐的浓度为0.001mol/L以上且0.3mol/L以下。

[0037] (5)根据(1)~(4)中任一项所述的血红素蛋白保存液,其还含有N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-乙磺酸。

[0038] (6)根据(1)~(5)中任一项所述的血红素蛋白保存液,其还含有用作标准样品或对照样品的血红素蛋白。

[0039] (7)根据(1)~(6)中任一项所述的血红素蛋白保存液,其用于免疫测定。

[0040] (8)一种血红素蛋白稳定化方法,其中,使二磺酸或其盐共存于含血红素蛋白的样品中。

[0041] (9)根据(8)所述的血红素蛋白稳定化方法,其中,二磺酸或其盐的浓度为0.001mol/L以上且0.3mol/L以下。

[0042] (10)一种血红素蛋白的免疫测定方法,其包括以下步骤:在二磺酸或其盐的存在下,使血红素蛋白与抗血红素蛋白抗体接触。

[0043] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本专利申请号2015-070667号的公开内容。

#### [0044] 发明效果

[0045] 根据本发明的血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法,能够抑制血红素蛋白变性或降解,稳定地保存血红素蛋白。

### 具体实施方式

[0046] 下面对本发明进行详细说明。

[0047] 本发明的血红素蛋白保存液含有二磺酸或其盐。另外,本发明的血红素蛋白稳定化方法是使二磺酸或其盐共存于含血红素蛋白的样品中。

[0048] 用于本发明的二磺酸或其盐没有特别限制,可从公知的物质中选择。用于本发明的二磺酸为具有至少一个可具有饱和或不饱和键的链式或环式烃基的二磺酸,特别优选为包含链式或环式烃基与2个磺基的二磺酸。用于本发明的二磺酸可具有链式烃基或环式烃基中的任一种,也可以具有这两种。

[0049] 特别是,用于本发明的二磺酸所具有的链式烃基为支链状或直链状的烃基。支链状烃基的主链或者直链状烃基中的碳原子数优选为1~10、更优选为1~4、进一步优选为1或2中的任意数。支链状烃基的主链或者直链状烃基优选为烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基或亚炔基。作为具有亚烃基的二磺酸,例如列举有:甲二磺酸、1,2-乙二磺酸(以下称为1,2-EDS)、1,3-丙二磺酸、1,4-丁二磺酸、1,5-戊二磺酸、1,6-己二磺酸等。

[0050] 另外,用于本发明的二磺酸所具有的环式烃基中的碳原子数优选为3~10中的任意数。环式烃基优选为环烷基、环烯基、环炔基或芳基。特别是,芳基优选为亚苯基或亚萘基。作为具有亚苯基或亚萘基的二磺酸,例如列举有:1,2-苯二磺酸、1,3-苯二磺酸、1,4-苯

二磺酸、1,6-萘二磺酸、2,6-萘二磺酸、2,7-萘二磺酸等。

[0051] 另外,环式烃基也可以为支链状烃基。此外,环式烃基也可以被1个以上、优选1~3个、更优选1~2个中任意个数的氮原子取代。作为具有氮原子取代的烃基的二磺酸,例如可举出哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)。

[0052] 另外更优选地,用于本发明的二磺酸为链式或环式烃基上结合有2个磺基的二磺酸。而且,具有链式烃基的二磺酸,优选在支链状烃基的主链或者直链状烃基的不同碳原子上具有2个磺基,更优选为在这些的各个末端上具有2个磺基。用于本发明的二磺酸优选为1,2-乙二磺酸(1,2-EDS)。

[0053] 用于本发明的二磺酸的烃基可以具有卤素基团和/或羟基等取代基。另外,具有支链状烃基的二磺酸,其支链优选包含烃。此外,用于本发明的二磺酸或其盐至少为一种,也可以为两种以上混合而成的混合物。

[0054] 根据本发明,通过在保存液或样品中含有血红素蛋白和二磺酸或其盐,可以抑制血红素蛋白变性或降解。尤其是,根据本发明,通过二磺酸含有乙二磺酸,可以进一步提高血红素蛋白的稳定性。用于本发明的二磺酸不会对测定产生不良影响,尤其适合于利用乳胶凝集法的免疫测定方法。

[0055] 用于本发明的二磺酸盐没有特别限制,为二磺酸的一价、二价或三价金属盐。作为二磺酸的盐,例如列举有:碱金属盐、铵盐、碱土金属盐、铁盐或铝盐等。作为碱金属,例如列举有:锂、钠、钾、铷、铯。作为碱土金属,例如列举有:钙、锶、钡、镭。

[0056] 本发明的血红素蛋白保存液或含血红素蛋白的样品中所含有的二磺酸或其盐的浓度上限为0.3mol/L以下、更优选为0.2mol/L以下、进一步优选为0.15mol/L以下;下限为0.001mol/L以上、更优选为0.005mol/L以上、进一步优选为0.01mol/L以上、最优选为0.02mol/L以上。如果二磺酸或其盐的浓度低于0.001mol/L,则对血红素蛋白的稳定化效果会变得不充分。另一方面,如果二磺酸或其盐的浓度超过0.3mol/L,则不仅会抑制免疫反应,容易影响测定,还将无法获得充分的血红素蛋白稳定化效果。

[0057] 作为本发明对象的血红素蛋白和本发明样品所含有的血红素蛋白,可从以血红素为组成成分的蛋白质中适当选择。作为血红素蛋白,例如列举有:血红蛋白、肌红蛋白、过氧化物酶或过氧化氢酶等。尤其是,作为本发明对象的血红素蛋白和本发明样品所含有的血红素蛋白,优选为作为免疫分析对象的血红素蛋白,更优选为人血红蛋白。免疫测定法中,保持检测对象的抗原性十分重要,而根据本发明,由于能够保持血红素蛋白的抗原性,因此可以进行更加精确的血红素蛋白的测定。尤其是,通过将作为本发明对象的血红素蛋白和本发明样品所含有的血红素蛋白作为生物样品中的血红蛋白,可以期待在大肠癌等疾病的诊断中防止测定结果出现错误。血红蛋白可以包括:粪便中含有的血红蛋白、由红细胞制备的含血红蛋白的标准样品或作为对照而市售的血红蛋白,以及冷冻干燥的血红蛋白等。

[0058] 另外,本发明的血红素蛋白保存液或含血红素蛋白的样品,可以含有能够溶解血红素蛋白的溶液。作为溶液,只要是能够溶解血红素蛋白的溶液即可,例如可举出缓冲液;作为用于制备缓冲液的缓冲剂,只要具有缓冲能力则没有特别限制,例如列举有:Good缓冲剂及磷酸缓冲剂、Tris缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、硼酸缓冲剂等。

[0059] 而且,作为Good缓冲剂,例如列举有:2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲剂、双(2-羟乙基)亚氨基-三(羟甲基)甲烷(Bis-Tris)缓冲剂、N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸(ADA)缓冲剂、哌

嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂、N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸(ACES)缓冲剂、3-吗啉-2-羟基丙磺酸(MOPS)缓冲剂、N,N'-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)缓冲剂、3-吗啉丙磺酸(MOPS)缓冲剂、N-[三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸(TES)缓冲剂、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-乙磺酸(HEPES)缓冲剂、3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸(DIPS)缓冲剂、3-[N-三(羟甲基)甲氨基]-2-羟基丙磺酸(TAPS)缓冲剂、哌嗪-N,N'-双(2-羧丙基-3-磺酸)(POPS)缓冲剂、N-(2-羧乙基)-N'-(2-羧基-3-磺丙基)哌嗪(HEPPS)缓冲剂、N-(2-羧乙基)-N'-(3-磺丙基)哌嗪(EPPS)缓冲剂、Tricine[N-三(羧甲基)甲基甘氨酸]缓冲剂、Bicine[N,N-双(2-羧乙基)甘氨酸]缓冲剂、3-[N-三(羧甲基)甲基]氨基丙磺酸(TAPS)缓冲剂、2-(N-环己基氨基)乙磺酸(CHES)缓冲剂、3-(N-环己基氨基)-2-羟基丙磺酸(CAPSO)缓冲剂、3-(N-环己基氨基)丙磺酸(CAPS)缓冲剂等。尤其是,在本发明中,Good缓冲剂优选使用HEPES,通过使二磺酸或其盐共存,可以显著提高血红素蛋白的稳定性。

[0060] 缓冲剂的浓度只要是适于测定的浓度则没有特别限制,为0.001~2.0mol/L,优选为0.005~1.5mol/L,进一步优选为0.01~1.0mol/L。

[0061] 另外,本发明的血红素蛋白保存液或含血红素蛋白的样品的pH值优选为中性范围,优选5~10,更优选6~8的范围。如果pH值低于5或高于10,则会破坏血红素蛋白的稳定性,血红素蛋白容易变性或降解。pH值可按照公知方法进行调节,也可使用NaOH及适当的缓冲剂进行调节。

[0062] 而且,本发明的血红素蛋白保存液或含血红素蛋白的样品,可以含有水溶性过渡金属配合物、亚铁氰化物、血红蛋白酶解产物、过渡金属类、有机酸、亚氨基羧酸、以白蛋白及明胶为代表的非活性蛋白、叠氮化钠等公知的蛋白保护剂。此外,也可含有用于防止微生物不必要繁殖的抗微生物剂等。而且,在不损害本发明效果的范围内,根据需要也可以含有盐、絮凝剂等成分。根据本发明,可以与现有的蛋白保护剂和抗微生物剂等共同提高血红素蛋白的稳定性,不会抑制现有的蛋白保护剂和抗微生物剂等的作用。

[0063] 另外,本发明的血红素蛋白保存液或含血红素蛋白的样品,在含有白蛋白的情况下,作为白蛋白,可使用牛、马、猪、绵羊、兔、人、大鼠等的白蛋白,也可使用含有白蛋白的血清。本发明的血红素蛋白保存液或含血红素蛋白的样品中的白蛋白浓度为0.0005w/v%~2.0w/v%,更优选为0.01w/v%~0.5w/v%。

[0064] 血红素蛋白的测定方法没有特别限制,为使用抗血红素蛋白抗体(与血红素蛋白特异性结合的抗体)的免疫测定法,优选为使用抗人血红素蛋白抗体的免疫测定法。具体而言,在样品中,在二磺酸或其盐的存在下,使血红素蛋白(例如人血红蛋白)与抗血红素蛋白抗体(例如抗人血红蛋白抗体)接触,发生抗原抗体反应,根据形成的免疫复合物检测或测定该样品中的血红素蛋白。当血红素蛋白为人血红蛋白时,作为人血红蛋白的免疫测定法,例如列举有:对在琼脂平板内抗人血红蛋白抗体与被测样品中的人血红蛋白结合而形成的免疫复合物沉淀线的出现进行确认的单向放射免疫扩散法;利用使抗人血红蛋白抗体致敏的乳胶粒子的乳胶凝集法;利用用酶及放射性元素标记的抗人血红蛋白抗体的酶免疫测定法及放射免疫测定法;利用使抗人血红蛋白抗体致敏的胶体金粒子的胶体金比色法;在硝酸纤维素膜等薄膜上,利用对用金属胶体等标记的抗人血红蛋白抗体和该抗人血红蛋白抗体与人血红蛋白的免疫复合物进行捕获的捕获抗体的免疫层析法等。具体而言,乳胶凝集法中,使抗人血红蛋白抗体致敏的乳胶粒子与样品中的人血红蛋白反应,形成免疫复合物

而使乳胶粒子凝集,根据该乳胶粒子的凝集引起的浊度变化,测定人血红蛋白。另外,免疫层析法中,在硝酸纤维素膜等薄膜上,供给样品,样品中的人血红蛋白在对用金属胶体等标记的抗人血红蛋白抗体进行保持的标记试剂保持部与抗人血红蛋白抗体反应,形成免疫复合物,而且免疫复合物通过毛细作用在薄膜上移动,该免疫复合物被固定在薄膜规定位置上的捕获抗体捕获,根据该捕获引起的显色来检测人血红蛋白。无论在哪种测定方法中,利用含有二磺酸或其盐的本发明的血红素蛋白保存液或含血红素蛋白的样品,都可以保护血红素蛋白的抗原活性,防止测定值的错误。

[0065] 本发明的血红素蛋白保存液可作为用于保存血红素蛋白的溶液而用于各种用途,例如,可用作粪便、尿和血液等生物样品来源的血红素蛋白的溶解用溶液、稀释液和提取液等溶液。特别是可作为用于检测血红素蛋白的检查,例如便潜血检查的粪便检体用稀释液。

[0066] 另外,本发明的血红素蛋白保存液也可以含有作为上述本发明对象的血红素蛋白,可用作含血红素蛋白的各种溶液。同样地,本发明的血红素蛋白稳定化方法可适用于含血红素蛋白的各种样品。例如,本发明的血红素蛋白保存液和含血红素蛋白的样品,可用作含血红素蛋白的标准样品或含血红素蛋白的对照样品等,尤其是用于自动分析装置校准或精度管理的含血红素蛋白的标准样品或含血红素蛋白的对照样品。含血红素蛋白的标准样品或含血红素蛋白的对照样品,即使在长期保存的情况下,也需要使血红素蛋白的测定值保持不变,根据本发明,即使在较高温度保存的情况下,也能抑制标准样品和对照样品中血红素蛋白变性或降解,因此可以有助于血红素蛋白测定值的稳定化。因此,本发明的血红素蛋白保存液和含血红素蛋白的样品,优选作为含血红素蛋白的标准样品和对照样品。

[0067] 而且,本发明的血红素蛋白保存液也可以提供为例如用于便潜血检查等的血红素蛋白(例如人血红蛋白)免疫测定用试剂盒。该试剂盒除了本发明的血红素蛋白保存液以外,还可以含有:采便容器等样品保存容器、试剂盒使用说明书;例如当免疫测定法为乳胶凝集法时,使抗人血红素蛋白抗体致敏的乳胶液、稀释液等;或者当免疫测定法为免疫层析法时,免疫层析设备(例如,支撑在支撑体上的硝酸纤维素膜等薄膜,所述支撑体具有样品供给部、对用金属胶体等标记的抗血红素蛋白抗体进行保持的标记试剂保持部和含有固定在规定位置上的捕获抗体的检测部)等。

[0068] 下面通过实施例对本发明进行更加详细的说明,但本发明并不受这些实施例限制。

[0069] 实施例

[0070] 实施例1

[0071] 配制含有0.3w/v%的牛血清白蛋白、NaOH和作为缓冲液的0.05mol/L的磷酸缓冲液,且余量为纯水的pH值7.0的溶液。向该溶液中添加1,2-EDS作为添加物,使浓度达到表1所示的各浓度(0.01~0.2mol/L),配制各浓度的溶液。向该配制的各溶液10mL中添加溶血的血红蛋白,达到600ng/mL,以此作为样品。

[0072] 添加血红蛋白后,立即测定各样品的血红蛋白浓度(刚添加后的浓度)。接着,在37℃下保存各样品。将血红蛋白的添加时间计为保存0小时,在保存6小时后和保存24小时后测定各样品的血红蛋白浓度(保存6小时后浓度和保存24小时后浓度)。

[0073] 血红蛋白的浓度测定是使用OC-SENSOR DIANA分析仪(荣研化学株式会社制造),使用以免疫测定法之一的乳胶凝集反应作为测定原理的专用试剂(OC HEM DIANA AUTO(OC

ヘモディアオート) III: 荣研化学株式会社制造) 进行测定。详细而言, 从样品中采集35μL作为试验液, 向该试验液中加入乳胶乳液(20vol%的抗人血红蛋白兔多克隆抗体致敏乳胶液) 60μL和稀释液(11.92mg/mL的HEPES) 300μL, 在波长660nm处测定吸光度。基于预先绘制的标准曲线, 根据获得的测定值来确定试验液中的血红蛋白浓度。对各样品进行3次测定, 将测定结果的平均值作为各样品的血红蛋白浓度。

[0074] 根据测定的血红蛋白浓度, 按照下式计算血红蛋白残留率。

[0075] 保存6小时后或保存24小时后的血红蛋白残留率[%] = 100 × 血红蛋白的保存6小时后浓度或保存24小时后浓度[ng/mL] / 对照样品中刚添加后的浓度[ng/mL]

[0076] 即, 各样品的血红蛋白残留率为将在对照样品中刚添加血红蛋白后的浓度设为100%时的相对值。本实施例中的对照样品为含有牛血清白蛋白和NaOH的磷酸缓冲液(不含1,2-EDS), 对照样品中刚添加后的浓度为583ng/mL。将结果示于表1。

[0077] [表1]

缓冲液	添加物	添加物浓度 [mM]	残留率[%]	
			保存 6小时后	保存 24小时后
[0078]	磷酸(对照)	无	0	49.4
	磷酸	1,2-EDS	10	52.5
	磷酸	1,2-EDS	20	56.3
	磷酸	1,2-EDS	40	61.9
	磷酸	1,2-EDS	60	59.7
	磷酸	1,2-EDS	100	65.4
	磷酸	1,2-EDS	150	71.5
	磷酸	1,2-EDS	200	46.2
				7.9

[0079] (注) 残留率是将对照样品中刚添加后的浓度(583ng/mL)设为100%时的相对值

[0080] 如表1所示, 含有作为二磺酸的1,2-EDS的样品与对照样品相比, 保存6小时后和保存24小时后的残留率高, 可知1,2-EDS具有对血红蛋白的稳定化效果。而且还可知, 随着1,2-EDS浓度的增加, 残留率变高, 血红蛋白的稳定化效果提高。

[0081] 实施例2

[0082] 使用0.05mol/L的N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-乙磺酸(以下称为HEPES)来代替磷酸缓冲液, 并添加1,2-EDS以达到表2所示的各浓度(0.005~0.2mol/L), 除了上述之外, 与实施例1同样地配制样品, 测定血红蛋白浓度。将结果示于表2。需要说明的是, 各样品的残留率是用将在对照样品(含有牛血清白蛋白和NaOH的HEPES缓冲液(不含1,2-EDS))中刚添加后的浓度(576ng/mL)设为100%时的相对值来表示的。

[0083] [表2]

缓冲液	添加物	添加物浓度 [mM]	残留率[%]	
			保存 6小时后	保存 24小时后
[0084]	HEPES (对照)	无	0	61.8
	HEPES	1,2-EDS	5	64.3
	HEPES	1,2-EDS	10	65.2
	HEPES	1,2-EDS	20	67.1
	HEPES	1,2-EDS	40	68.5
	HEPES	1,2-EDS	60	71.3
	HEPES	1,2-EDS	100	72.4
	HEPES	1,2-EDS	150	72.8
	HEPES	1,2-EDS	200	73.1

[0085] (注) 残留率是将对照样品中刚添加后的浓度 (576ng/mL) 设为100%时的相对值

[0086] 如表2所示,含有作为二磺酸的1,2-EDS的样品与对照样品相比,保存6小时后和保存24小时后的残留率高,可知1,2-EDS具有对血红蛋白的稳定化效果。尤其可知,通过含有HEPES和1,2-EDS,即使在1,2-EDS的添加浓度为5mM的低浓度的样品中,保存6小时后和保存24小时后的残留率也高。而且还可知,随着1,2-EDS的添加浓度的增加,残留率变高,血红蛋白的稳定化效果提高。

[0087] 实施例3

[0088] 使用0.05mol/L的HEPES、0.05mol/L的哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸) (以下称为PIPES) 或0.05mol/L的2-吗啉乙磺酸 (以下称为MES) 来代替磷酸缓冲液,并添加1,2-EDS以达到表3所示的浓度,除了上述之外,与实施例1同样地配制样品,测定血红蛋白浓度。将结果示于表3。需要说明的是,各样品的残留率是用将在对照样品 (含有牛血清白蛋白和NaOH的磷酸缓冲液 (不含1,2-EDS)) 中刚添加后的浓度 (583ng/mL) 设为100%时的相对值来表示的。

[0089] [表3]

缓冲液	添加物	添加物浓度 [mM]	残留率[%]	
			保存 6小时后	保存 24小时后
[0090]	磷酸 (对照)	无	0	49.4
	磷酸	1,2-EDS	20	56.3
	HEPES	无	0	46.3
	HEPES	1,2-EDS	20	67.6
	PIPES	无	0	50.4
	PIPES	1,2-EDS	20	63.6
	MES	无	0	54.6
	MES	1,2-EDS	20	65.9

[0091] (注) 残留率是将对照样品中刚添加后的浓度 (583ng/mL) 设为100%时的相对值

[0092] 如表3所示,即使在缓冲液不同的样品中,也可见1,2-EDS对血红蛋白的稳定化效果。尤其可知,含有HEPES和1,2-EDS的样品与将HEPES作为缓冲液但不含有1,2-EDS的样品相比,保存6小时后和保存24小时后的残留率明显地高,抑制血红蛋白变性或降解的效果极佳,同时提示可长期使血红蛋白稳定化。另外可知,含有HEPES和1,2-EDS的样品与含有作为Good缓冲剂的PIPES、MES、1,2-EDS的样品相比,保存6小时后和保存24小时后的残留率也高,抑制血红蛋白变性或降解的效果进一步提高,因此具有协同性的血红蛋白稳定化效果。

[0093] 实施例4

[0094] 使用1,4-丁二磺酸(以下称为1,4-BDS)或2,6-萘二磺酸(以下称为2,6-NDS)来代替1,2-EDS,并添加PIPES以达到表4所示的浓度,以及使用0.05mol/L的HEPES来代替磷酸缓冲液,除了上述之外,与实施例1同样地配制样品,测定血红蛋白浓度。将结果示于表4。需要说明的是,各样品的残留率是用将在对照样品(含有牛血清白蛋白和NaOH的磷酸缓冲液(不含二磺酸))中刚添加后的浓度(548ng/mL)设为100%时的相对值来表示的。

[0095] [表4]

缓冲液	添加物	添加物浓度 [mM]	残留率[%]	
			保存 6小时后	保存 24小时后
[0096]	磷酸(对照)	无	49.8	6.2
	磷酸	1,4-BDS	68.3	14.5
	磷酸	1,4-BDS	69.9	18.4
	磷酸	2,6-NDS	55.7	11.1
	磷酸	PIPES	58.4	10.4
	HEPES	无	64.9	12.5
	HEPES	1,4-BDS	74.7	28.4

[0097] (注) 残留率是将对照样品中刚添加后的浓度(548ng/mL)设为100%时的相对值

[0098] 如表4所示,可知作为二磺酸的1,4-BDS、2,6-NDS和PIPES具有对血红蛋白的稳定化效果。

[0099] 比较例1

[0100] 添加8-苯胺基-1-萘磺酸(以下称为ANS)或2-巯基乙磺酸钠(以下称为MESS)来代替1,2-EDS并达到0.01mol/L,除了上述之外,与实施例1同样地配制样品,测定血红蛋白浓度。将结果示于表5。需要说明的是,各样品的残留率是用将在对照样品(含有牛血清白蛋白和NaOH的磷酸缓冲液(不含添加物))中刚添加后的浓度(583ng/mL)设为100%时的相对值来表示的。

[0101] [表5]

缓冲液	添加物	添加物浓度 [mM]	残留率[%]	
			保存 6小时后	保存 24小时后
磷酸 (对照)	无	0	49.4	7.1
磷酸	1,2-EDS	10	52.5	7.5
磷酸	ANS	10	2.6	2.5
磷酸	MESS	10	33.4	3.3

[0102] (注) 残留率是将对照样品中刚添加后的浓度 (583ng/mL) 设为100%时的相对值

[0103] [0104] 如表5所示,可知在含磷酸但不含二磷酸的样品中,血红蛋白有可能发生变性或降解。

[0105] 因此显示出含有1,4-BDS、2,6-NDS和1,2-EDS等二磷酸的保存液和样品,即使在37℃的高温下保存,保存6小时后和保存24小时后的血红蛋白残留率也能较高地保持。由该结果可知,本发明的含有二磷酸的保存液和样品即使在伴随温度上升和时间推移的情况下,也能抑制血红蛋白变性或降解,具有对血红蛋白的稳定化效果。

[0106] 另外,向实施例1~实施例4以及比较例1的各样品中添加粪便检体,进行同样的测定,结果可看到与实施例1~实施例4以及比较例1的测定结果具有相同的趋势。

[0107] 根据上述内容可知,根据含有二磷酸或其盐的本发明的血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法,能够抑制血红素蛋白变性或降解,使血红素蛋白稳定化。

[0108] 工业实用性

[0109] 根据本发明的血红素蛋白保存液和血红素蛋白稳定化方法,能够抑制血红素蛋白变性或降解,稳定地保存血红素蛋白,可以稳定地保存含有便潜血检查的粪便检体用稀释液、血红素蛋白的标准样品和含血红素蛋白的对照样品等血红素蛋白。

[0110] 本说明书所引用的全部刊物、专利和专利申请通过直接引用而编入本说明书。