

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/32

G01N 33/50



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 00133945.1

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1186454C

[22] 申请日 2000.11.9 [21] 申请号 00133945.1

[30] 优先权

[32] 1999.11.10 [33] JP [31] 319569/1999

[32] 2000. 5.17 [33] JP [31] 144414/2000

[71] 专利权人 第一化学药品株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 海老沼宏幸 牛泽幸司

审查员 孟海燕

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 沙永生

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称 甘露糖的定量测定方法及其试剂

[57] 摘要

本发明公开一种定量测定甘露糖的方法，包括在电子受体存在下，将生物样本或从所述生物样本制得的样本中的甘露糖与一种可直接与甘露糖反应使其氧化的酶进行反应，并定量测定所形成的电子受体还原物；以及定量测定甘露糖的试剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 定量测定甘露糖的方法，其特征在于：包括在电子受体存在下，将生物样本或从所述生物样本制得的样本中的甘露糖与一种可直接与甘露糖发生脱氢反应使其氧化的酶进行反应，并定量测定所形成的电子受体还原物。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中样本除甘露糖外还含有葡萄糖，在与酶反应前用葡萄糖消除剂将样本中的葡萄糖转化为不与酶反应的结构。

3. 如权利要求 1 和 2 之一所述的方法，其中酶为属于酶编号 EC 1.1.1.119 的葡萄糖脱氢酶。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中酶为来自属于葡糖杆菌属的微生物的己醛糖脱氢酶。

5. 如权利要求 2 所述的方法，其中葡萄糖消除剂包含葡萄糖 6-位磷酸化酶和腺苷三磷酸。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中电子受体是氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸辅酶。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中样本为选自血液、血清、血浆、脑脊液和尿液的至少一种生物样本，或从所述生物样本制得的样本。

8. 定量测定甘露糖的试剂，所述试剂是用于定量测定生物样本中或从所述生物样本制得的样本中的甘露醇的试剂，它包括在电子受体存在下一种可直接与甘露糖发生脱氢反应使其氧化的酶，及对酶有用的电子受体。

9. 如权利要求 8 所述的试剂，其中还包括葡萄糖消除剂。

10. 如权利要求 8 和 9 之一所述的试剂，其中酶是属于酶编号 EC 1.1.1.119 的葡萄糖脱氢酶。

11. 如权利要求 8 或 9 所述的试剂，其中酶是来自属于葡糖杆菌属的微生物的己醛糖脱氢酶。

12. 如权利要求 9 所述的试剂，其中，其中葡萄糖消除剂包含葡萄糖 6-位磷酸化酶和腺苷三磷酸。

13. 如权利要求 8 或 9 所述的试剂，其中电子受体是氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸辅酶。

甘露糖的定量测定方法及其试剂

- 5 本发明涉及用酶学方法精确和方便地定量测定甘露糖的方法及定量测定用试剂。

甘露糖是己糖型的，微量存在于人血。作为供应途径，已知主要通过葡萄糖代谢系统供应甘露糖，而不是通过食物的摄入。甘露糖的血浓度通常低至约0.5mg/dl。但是，已知在患者罹患糖尿病时该浓度有高的倾向，这些患者缺乏控制血糖(Clinica. Chimica Acta 251; 1996 pp 91-103)或真菌感染(J. Clin. Microbiol. 21(6); 1985 pp 972-979)的能力，有人提议甘露糖浓度对于这些疾病的诊断有用。

测定甘露糖的方法已知有气相色谱法(Clin. Chem. 25; 1979; pp 1384-1387)、液相色谱法(Bulletin of Japan Urology Association, 80; 1989; pp 1816-1823)酶学方法(Clin. Chem. 30(2); 1984 pp 293-294)等。

例如，在酶学方法中，因为如果样本或样品中含有葡萄糖则难以进行精确测定，所以必须消除葡萄糖。在Soyama等的方法(Clin. Chem. 30; 1984 pp 293-294)中，先用葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶消除样本中的葡萄糖。然后，在三磷酸腺苷(下文称作 ATP)存在下，将甘露糖与己糖激酶反应，将其转化为甘露糖-6-磷酸，再与甘露糖-6-磷酸异构酶反应转化为 6-磷酸果糖，进一步与葡糖-6-磷酸异构酶反应，将其转化为葡糖-6-磷酸，最后，在辅酶氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(下文称作 NAD)存在下，与葡糖-6-磷酸脱氢酶反应，然后，用分光光度计测定所形成的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(下文称作 NADH)的吸光度(340nm)以定量测定甘露糖。

25 作为上述酶学方法的改进，Pitkanen 等报告了一种定量测定甘露糖的方法(Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem 35(10); 1997 pp761-766)，其中，在ATP和氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(下文称作 NADP)存在下，将己糖激酶和葡糖-6-磷酸异构酶与同时存在葡萄糖和果糖的样本反应，从而将葡萄糖和果糖转化为葡糖-6-磷酸；再加入葡糖-6-磷酸脱氢酶将葡糖-6-磷酸转化为葡糖酸内酯-6-磷酸；所形成的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(下文称作 NADPH)用盐酸在酸性条件下降解以消除葡萄糖等的影响；然后以上述同样的方法，在ATP和NADP存在

下, 将甘露糖与己糖激酶、甘露糖-6-磷酸异构酶、葡萄糖 6-磷酸异构酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶反应, 测定所形成的 NADPH 的吸光度(340nm)。

但是, 在上述酶学方法中, 由于需要处理复杂的酶接合系统, 其中各种酶促反应结合在一起, 因此难以使所有酶处于最适条件。而且, 由于各种昂贵的酶结合在一起使用, 因此在成本方面有问题。此外, 还有一个缺点, 即这些方法对来自生物样本或杂质的成分的影响敏感。

另一方面, 在气相色谱法和液相色谱法中, 必须进行麻烦的操作, 如衍生化或诸如荧光之类标记, 及使用特殊仪器, 因此这些方法不适合于处理大量样本。

本发明的一个目的是提供定量测定甘露糖的方法及定量测定用试剂。用它们可进行大量样本的精确和方便的处理。

为了完成上述目的, 一方面, 本发明提供定量测定甘露糖的方法, 包括在电子受体存在下将样本中的甘露糖与能通过脱氢反应氧化甘露糖的酶进行反应, 并定量测定所形成的电子受体还原物。

上述方法中, 当样本除甘露糖外还含有葡萄糖时, 较佳为在与酶反应前用葡萄糖消除剂将样本中的葡萄糖转化为不与酶反应的结构。

上述方法中, 酶较佳为属于酶编号 EC 类 1.1.1.119 的葡萄糖脱氢酶, 更佳为来自属于葡糖杆菌属的微生物的己醛糖脱氢酶。作为样本, 较佳为选自血液、血清、血浆、脑脊液和尿液的至少一种生物样本, 或从所述生物样本制得的样本。

另一方面, 本发明提供定量测定用试剂, 包括在电子受体存在下能通过脱氢反应氧化甘露糖的酶, 及对酶有用的电子受体。

该试剂较佳还包含葡萄糖消除剂。此外, 酶较佳为属于酶编号 EC 类 1.1.1.119 的葡萄糖脱氢酶, 更佳为来自属于葡糖杆菌属的微生物的己醛糖脱氢酶。此外, 葡萄糖消除剂较佳为包含葡萄糖 6-位磷酸化酶和腺苷三磷酸。且电子受体为辅酶 NADP。

按照本发明, 由于酶直接与甘露糖反应, 并能通过脱氢反应氧化甘露糖, 无需通过复杂的酶接合系统进行测定, 因此能方便地定量测定葡萄糖及进行大量样本的处理。而且, 使用葡萄糖消除剂时, 测定几乎不受样本中葡萄糖的影响, 因此能精确地定量测定甘露糖。

图 1 显示用含电子受体的第一试剂和含己醛糖脱氢酶的第二试剂测定各种浓度甘露糖的结果。

图 2 显示用含电子受体和葡萄糖消除剂的第一试剂和含己醛糖脱氢酶的第

二试剂测定各种浓度甘露糖的结果。

图 3 显示用含电子受体和葡萄糖消除剂的第一试剂和含己醛糖脱氢酶的第二试剂对含恒定浓度甘露糖和各种浓度葡萄糖的溶液进行测定的结果。

本发明中, 作为样本(试样), 并无特别限制, 只要意欲测定其甘露糖浓度。

- 5 但是, 较佳为使用生物样本, 如血液、血清、血浆、脑脊液和尿液, 或从所述生物样本制得的样本, 例如经各种方法预处理的样本, 从而可容易地测定甘露糖等。这样的预处理, 例如从有葡萄糖共存的样本中初步除去或消除葡萄糖的处理。

- 本发明中使用的酶无特别限制, 只要它能在电子受体存在下通过脱氢反应氧化甘露糖(下文称作“甘露糖脱氢酶”)。但是, 较佳可提到属于酶编号 EC 类
10 1.1.1.119 的酶。具体地可提到, 例如, 得自 OKAMOTO 的文献(J. Biochem. 53(5) 1963 pp348-353)中所述弱氧化醋菌的 NADP 依赖性葡萄糖脱氢酶、得自 AVIGAD 等文献(J. biol. Chem. 243(8) 1968 pp1936-1941)所述 *Gluconobacter cerinus* 的 NADP 依赖性己醛糖脱氢酶、DAHMS 等文献(J. biol. Chem. 247(7) 1972 pp2222-2227)所述 NAD 依赖性己醛糖脱氢酶及很多此类酶。

- 15 所述酶特别是得自属于葡糖杆菌属的微生物的己醛糖脱氢酶。属于葡糖杆菌属的微生物可提到例如 *gluconobacter asaii* (*G. assai*) IF0 3276, *Gluconobacter cerinus* (*G. cerinus*) IF0 3267, *Gluconobacter frateurii* (*G. frateurii*) IF0 3264, *Gluconobacter oxydans* (*G. oxydans*) IF0 14819 等。将这些微生物进行培养, 回收细胞, 然后用超声波处理或其它方法破坏细胞, 如
20 果需要, 合用柱层析如硫酸铵分级、离子交换层析、疏水层析、羟基磷灰石凝胶和凝胶过滤, 可得到酶。

所用的甘露糖脱氢酶的浓度无特别限制, 但较佳为 0.1-100 单位/升, 更佳为 1-10 单位/升。

- 本发明中, 可适当选用一种或几种辅酶作为电子受体, 如 NAD 和 NADP、氧、
25 吩嗪硫酸甲酯、二氯酚靛酚、铁氰化物、四唑鎓盐等。特别可取的是辅酶 NADP。所用电子受体的浓度较佳为 0.1-10 毫摩尔/升, 特佳为 0.5-2 毫摩尔/升。

- 为了进一步定量测定电子受体还原物, 采用通过电子受体的还原显色的生色剂。生色剂可根据所用电子受体加以适当选择。例如, 为了测定作为辅酶 NADP 还原物的 NADPH, 可有如下方法: 使四唑鎓盐与吩嗪硫酸甲酯或心肌黄酶共
30 存, 将形成的甲 染料作比色定量测定。

此外, 由于本发明中所用的甘露糖脱氢酶不但对甘露糖而且对葡萄糖起作

用, 看来受到葡萄糖的影响, 特别在待测甘露糖存在于生物样本如血清或血浆中时。因此, 为了提供对生物样本检测的精确性, 较佳为同时使用葡萄糖消除剂。作为葡萄糖消除剂, 较佳为使用含 ATP 和葡萄糖 6-位磷酸化的酶。

作为葡萄糖 6-位磷酸化酶, 可有葡糖激酶、己糖激酶等。无特别限制, 只要它属于 EC 2.7.1.2 或 EC 2,7.1.1, 和能从市售而得之一即可使用。但是, 对葡萄糖有高度选择性的葡糖激酶可优先使用。其用量根据样本中的葡萄糖量而定, 但一般为 0.1-50u/ml。葡萄糖磷酸化需用的 ATP 的量根据样本中葡萄糖的量而定, 但一般为 1-20mM。此外, 作为葡萄糖磷酸化的促进剂, 一般含约 5-50mM 的镁离子, 如无机或有机盐。为了消除葡萄糖而进行的葡萄糖磷酸化在加入 pH 6-10 的缓冲液后立即在 20-50℃温度进行, 较佳为 25-37℃, 约 10 分钟。

作为本发明有用的缓冲液, 一般可用 pH 6-10 的溶液, 如磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、Good's 缓冲液和硼酸缓冲液。

作为本发明的定量测定甘露糖的试剂, 可将葡萄糖消除剂和定量测定试剂分开制备、合并使用。更具体地, 较佳地可包括两种试剂, 即含电子接受体和葡萄糖消除剂的第一试剂和含甘露糖脱氢酶的第二试剂。

将甘露糖定量测定试剂加到用于反应的生物样本中, 然后测定反应液中还原的电子接受体, 例如在对电子接受体还原物特异的吸收波长测定吸光度, 或测定生色剂的显色强度, 该生色剂通过电子接受体的还原而显色。

下面将参照实施例对本发明作具体描述。但是, 应当提到本发明并不限于此。

酶的制备实施例(得自 *Gluconobacter asaii* 的己醛糖脱氢酶的制备)

将 *Gluconobacter asaii*(IFO 3276)接种在含 0.5%酵母提取物和 1%果糖的培养基上, 28℃振摇培养 24 小时, 然后离心分离, 得到细胞。将细胞悬浮于 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7)中, 在冰冷却下用超声振荡器处理, 将粉碎后的溶液离心分离, 除去细胞残渣, 得到粗制酶液。

在此粗制酶液中加入硫酸铵粉, 溶于其中, 从而硫酸铵的量为饱和度的 30%。离心分离除去沉淀的蛋白质。将所得上清液通过 Butyl toyopearl 柱使酶吸附于其上, 然后用含其量为饱和度的 30%-0%的硫酸铵的 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7)以线性梯度洗脱此酶。

测定各洗脱部分的酶活性, 回收活性部分。用 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7)将

活性部分透析除盐，然后使其通过 DEAE Toyopearl 柱将酶吸收于其上，并用含 0-0.25M NaCl 的 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 以线性梯度洗脱此酶。

测定各洗脱部分的酶活性，回收活性部分。用 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 将活性部分透析除盐，然后使其通过羟基磷灰石柱将酶吸收于其上，并用 20-150mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 以线性梯度洗脱此酶。测定各洗脱部分的酶活性，回收活性部分，此即纯化的酶液。

实施例 1

用上述酶制备实施例中所获得的己醛糖脱氢酶和作为电子接受体的辅酶 NADP，
10 制备如下所示的包含第一试剂和第二试剂的甘露糖定量测定试剂。

第一试剂 (pH 8.5)：

125mM Tris-HCl 缓冲液；

1.25mM NADP

0.75mM WST-1 (K. K. Dojin 科学研究所制造的 tradenade)；

15 1.25% Tween 20 (聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯)；

6.25 u/ml 心肌黄酶。

第二试剂 (pH 7.0)：

20mM 磷酸盐缓冲液；

23 u/ml 己醛糖脱氢酶。

20 用此试剂，如下所示测定各种浓度 (0-50 μ g/ml) 甘露糖溶液。

向各种浓度甘露糖溶液 8 μ l 中各加入第一试剂 256 μ l，于 37 $^{\circ}$ C 进行 5 分钟反应，然后加入第二试剂 56 μ l，同样于 37 $^{\circ}$ C 进行 5 分钟反应。最后，用两点法进行吸光度测定，主波长为 450nm，次波长为 700nm。用日立 7150 型自动分析仪进行这些操作。结果见图 1。

25 从图 1 可见，用甘露糖浓度 0-50 μ g/ml 得到线性光吸收，可在低浓度范围内进行甘露糖的精确定量测定。

实施例 2 (用同时含葡萄糖消除剂的试剂系统定量测定甘露糖)

用上述酶制备实施例中所获得的己醛糖脱氢酶、作为电子接受体的辅酶 NADP
30 和作为葡萄糖消除剂的葡萄糖激酶和 ATP，制备如下所示的包含第一试剂和第二试剂的甘露糖定量测定试剂。

第一试剂(pH 8.5):

125mM Tris-HCl 缓冲液;

1.25mM NADP

0.75mM WST-1(K. K. Dojin 科学研究所制造的 tradenade);

5 1.25% Tween 20(聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单月桂酸酯);

6.25 u/ml 心肌黄酶;

12.5 u/ml 葡糖激酶;

10mM ATP;

2mM 乙酸镁。

10 第二试剂(pH 7.0):

20mM 磷酸盐缓冲液;

23 u/ml 己醛糖脱氢酶。

首先,如实施例所述,将此试剂与各种浓度(0-50 μ g/ml)甘露糖溶液反应,测定反应液的吸光度。结果见图2。

15 然后,将上述试剂与含恒定浓度(约 10 μ g/ml)甘露糖和各种浓度(0-1,000mg/dl)葡萄糖的各溶液反应,测定反应液的吸光度。结果见图3。

从图2可见,用 0-50 μ g/ml 甘露糖浓度得到线性吸光度,即使在合用葡萄糖消除剂的试剂系统均能进行精确的甘露糖定量测定。

20 而且,从图3可见,即使样本中的葡萄糖浓度从 0-1,000mg/dl 不等,仍可得到基于甘露糖浓度的恒定吸光度。从此结果显然可见,即使在含高浓度葡萄糖的样本中,也可精确地定量测定样本中的甘露糖。

实施例 3

25 用实施例2的试剂测定甘露糖,关于样本的制备,系按1体积份与9体积份五种血清(血清 No. 1-5)中的一种之比,加入 100 μ g/ml 甘露糖水溶液,以加入纯水代替甘露糖水溶液的样本作为对照。用测得值和实施例2中所得校正曲线对甘露糖的量作定量测定,回收所加入甘露糖的化学计量量。结果如表1所示。

表 1

血清 No.	加入的甘露糖水溶液(A) ($\mu\text{g/ml}$)	加入的纯水(B) ($\mu\text{g/ml}$)	A-B ($\mu\text{g/ml}$)
1	15.4	5.6	9.8
2	15.4	6.1	9.2
3	16.9	7.3	9.6
4	19.5	9.9	9.6
5	13.9	4.4	9.5

从图 1 的结果可见,回收率极佳,达到所加甘露糖的化学计量,可进行血清中甘露糖的精确定量测定。

- 5 如上所述,按照本发明,在含甘露糖的样本中加入电子受体,用甘露糖脱氢酶与其反应,藉此甘露糖脱氢酶直接与甘露糖反应,将甘露糖氧化,同时直接还原电子受体,通过测定所形成的电子受体还原物,可高灵敏度地精确定量测定甘露糖。而且,由于反应系统简单,本发明可用于各种自动分析仪,并适合于大量样本的处理。
- 10 此外,合用葡萄糖消除剂以降低样本中共存的葡萄糖,使样本达到葡萄糖的影响基本上可忽略不计的水平,从而甚至在诸如血清或血浆等生物样本中也可用简单的操作达到高精密度的测定。

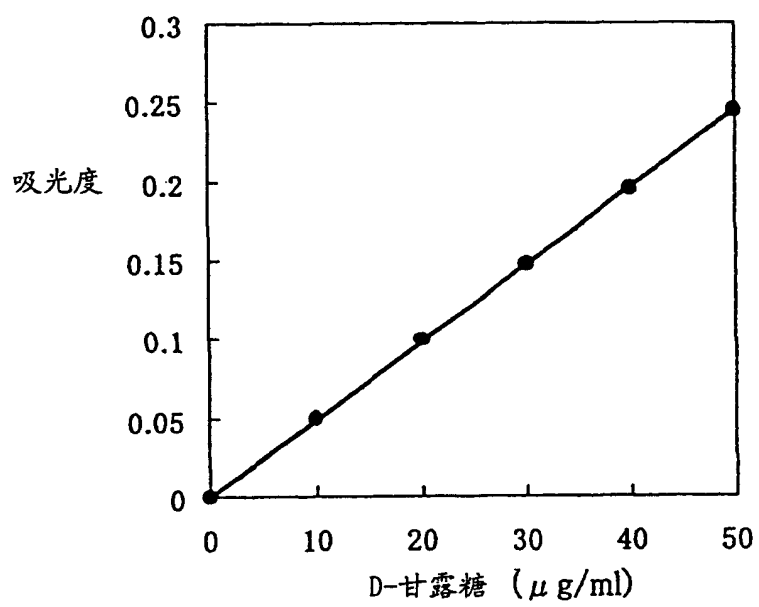


图 1

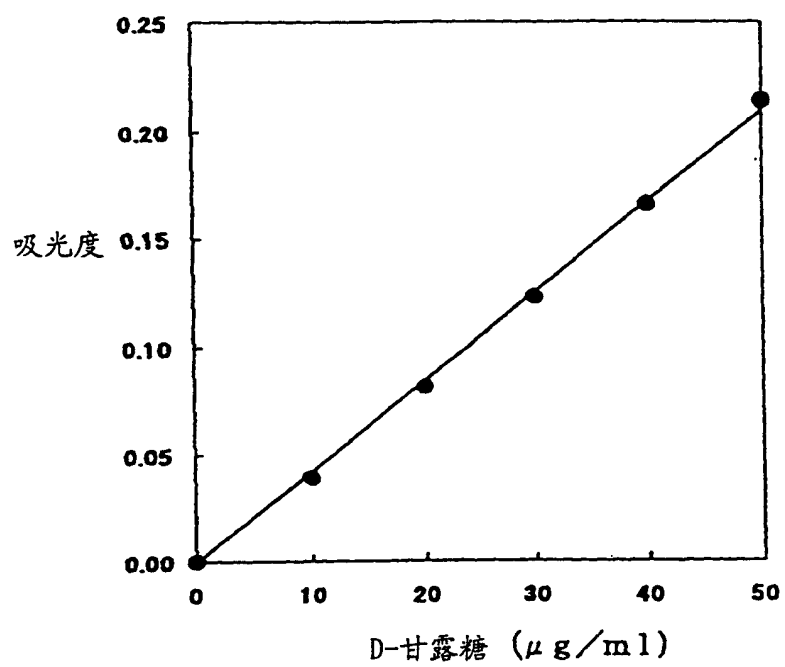


图 2

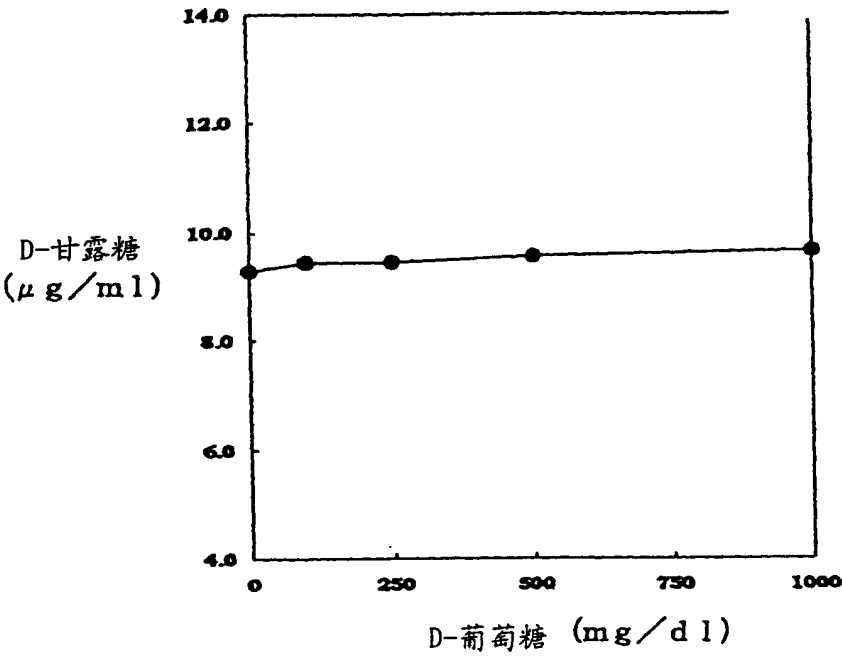


图 3