

公告本

申請日期	8/10/73
案 號	89122210
類 別	C12Q1/26

A4
C4

593681

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
新 型

一、發明 名稱	中 文	甘露糖之定量方法及定量用試劑
	英 文	QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD OF MANNOSE AND REAGENT THEREFOR
二、發明人 創作	姓 名	1. 海老沼宏幸 2. 牛澤幸司(牛沢幸司)
	國 籍	日本國
三、申請人	住、居所	1. 2. 地址同 日本國茨城縣龍之崎市向陽台 3-3-1 第一化學藥品股份有限公司 診斷藥研究所
	姓 名 (名稱)	第一化學藥品股份有限公司
	國 籍	日本國
	住、居所 (事務所)	日本國東京都中央區日本橋三丁目 13 番 5 號
	代 表 人 姓 名	橋浦十八

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

日本 國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☒有 ☐無主張優先權
1999 年 11 月 10 日 特願平 11-319569(主張優先權)
2000 年 5 月 17 日 特願 2000-144414(主張優先權)

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝訂線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

1. 技術領域：

本發明為關於一種正確且簡便之酵素法甘露糖定量法及定量用試劑。

2. 已往技術：

甘露糖為一種六碳糖、微量存在於人類血液中，已知其供應路徑並非自食物吸收而來，而主要是經葡萄糖代謝而來。另已知甘露糖在血液中之濃度，通常為 0.5mg/dl 程度屬微量，但在血糖控制不佳之糖尿病(Climica. Climica Acta 251; 1996 pp91-103)或真菌感染症(J. Clin. Microbiol. 21(6); 1985 pp972-979)患者中則會增高，因此顯示可用於此些疾病之診斷上。

以往所知之甘露糖測定法，有氣相層析法(Clin. Chem. 25; 1979; pp1384-1987)、液相層析法(日本泌尿會誌 80; 1989 1816-1823)、酵素法(Clin. Chem 30(2); 1984 pp293-294)等。

例如在酵素法中，若樣品中含葡萄糖，則無法正確地定量，因此需要去除葡萄糖，曾山等(Clin. Chem. 30; 1984 pp293-294)之方法即以葡萄糖氧化酶及觸酶預先除去樣品中之葡萄糖。之後，在腺苷三磷酸(以下稱之 ATP)存在下，由甘露糖與己糖激酶作用，轉換為甘露糖-6-磷酸酯、繼之經甘露糖-6 磷酸異構酶作用轉換為果糖-6 磷酸，再以葡萄糖-6 磷酸異構酶作用生成葡萄糖-6 磷酸，最後在輔酶氧化型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(以下稱之 NAD)存在下，由葡萄糖-6 磷酸脫氫酶作用，以分光光度計測定生成之還原型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(以下稱之 NADH。)之吸光度(340nm)，定量甘露糖量。

此外，上述酵素法之改良，有 Pitkanen 等報告之甘露糖定量方法(Em. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35(10); 1997 pp761-766)，為有葡萄糖或果糖共存之樣品中，在 ATP 及氧化型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(以下稱之 NADP)存在下，經己糖激酶、葡萄糖-6 磷酸異構酶作用，將葡萄糖或果糖轉換為葡萄糖-6 磷酸，再添加葡萄糖-6 磷酸脫氫酶，將葡萄糖-6 磷酸轉換為葡萄糖酸-6 磷酸，此時產生之還原型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(以下稱之 NADPH。)則在鹽酸酸性下分解即可除去葡萄糖等之影響，之後再以上述相同之方法，在 ATP 及 NADP 存在下，以吸光度(340nm)測定甘露糖經己糖激酶、甘露糖-6 磷酸異構酶、葡萄糖-6 磷酸異構酶、葡萄糖-6 磷酸脫氫酶作用產生之 NADPH。

3.發明欲解決之課題

然而上述之酵素法因係經由數種酵素反應組合成複雜之酵素共軛素，因此所有之酵素難以達至最適化，且因使用許多高價酵素配合，在成本上亦有問題。此外，也有受生物體樣品俱來之成份及夾雜物影響之缺點。

另一方面，氣相層析法及液相層析法，必需經衍生物化及螢光等標識化等煩複之操作，又需要有特殊之設備，在處理檢體數多時有所不便。

因此，本發明之目的，在提供一種可以正確且簡便地處理多數檢體之甘露糖定量法及定量用試劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(3)

4. 解決課題之手段

為達成上述目的，本發明第一在提供甘糖定並法，其特徵為在電子接受體存在下，樣品中之甘露糖經對甘露糖具脫氧之氧化能力的酵素作用，而定量生成之電子接受體還原體之量。

前述定量法中，在上述樣品中含甘露糖以外之葡萄糖時，最好在上述樣品中之葡萄糖以葡萄糖消除劑將其轉換為不與上述酵素發生反應之構造後，再與上述酵素作用。

同時，上述定量法中，上述酵素以酵素號碼 EC 類 1. 1. 1. 119 分類之葡萄糖脫氫酶為佳，Gluconobacter 屬所屬微生物來源之己醛糖脫氫酶則更佳。樣品，則以血液、血清、血漿、骨髓液及尿之群中選擇之 1 種生物樣品，或由該生物樣品調製之樣品為佳。

本發明第二在提供甘露糖之定量用試劑，特徵為含於電子接受體存在下具有對甘露糖脫氫氧化能力的酵素，及該酵素可利用之上述電子接受體。

上述試劑中，若再另含葡萄糖消除劑則更佳。同時，上述酵素，以屬酵素分類號碼 EC 類 1. 1. 1. 119 之葡萄糖脫氫酶為佳，為由 Gluconobacter 屬微生物而來之己醛糖脫氫酶則更佳。此外，上述葡萄糖消除劑，以含葡萄糖 6 位磷酸化酵素及腺嘌呤三磷酸者為佳。此外，上述電子接受體以輔酶 NADP 為佳。

本發明因為非經複雜之酵素共軛系，而以具有直接作用甘露糖脫氫而氧化能力之酵素，因此可簡便地定量甘露

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

糖，而可以處理數量多之檢體。此外，使用葡萄糖消除劑時，因不易受樣品中葡萄糖之影響，因此，可以正確地定量甘露糖。

5.發明實施之形態

本發明中之樣品，只要為欲測定甘露糖之濃度者並無特別之限定，可以為血液、血清、血漿、骨髓液、尿等生物樣品，或其生物樣品所調製之樣品，可使用經例如能使甘露糖易於測定之各種方法前處理的樣品。此種前處理之例可舉如預先去除有葡萄糖共存樣品中之葡萄糖。

本發明中使用之酵素，只要為電子接受體存在下，具有對甘露糖脫氫氧化能力之酵素(以下稱之「甘露糖脫氫酵素」)即可，並無特別限定，最好是例如酵素號碼 EC 類 1.1.1.119 分類之酵素。具體之例可舉如在 OKAMOTO 之文獻中(J. Biochem. 53(5)1963 pp348-353)記載之

Acetobacter suboxydans 得到之 NADP 依存性葡萄糖去氫酶，AVIGAD 等之文獻(J. Biol. Chem. 243(8) 1968 pp1936-1941)中則記載 Gluconobacter cerinus 得到之 NADP 依存性己醛糖去氫酶，DAHMS 等之文獻(J. Biol. Chem. 247(7) 1972 pp2222-2227)中記載之 NAD 依存性己醛糖去氫酶等。

上述酵素特別以由 Gluconobacter 屬之微生物來之己醛糖去氫酶為佳。Gluconobacter 屬微生物之例可舉如：Gluconobacter asaii (G. asaii)IFO 3276、Gluconobacter cerinus (G. cerinus) IFO 3267、Gluconobacter frateurii (G.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

frateurii) IFO 3264、Gluconobacter oxydans (G. oxydans) IFO 14819 等，將菌體以超音波處理等破菌得到之破菌液，依需要經硫酸銨區分、離子交換層析、疏水性層析、羥磷灰石膠體、膠體過濾等管柱層析組合精製即可得到酵素。

甘露糖脫氫酶之使用濃度並無特別限定，最好是 0.1 至 100 單位/公升，特別是 1 至 10 單位/公升範圍。

本發明中，電子接受體，可以自 NAD、NADP 等輔酶、氧、吩嗪甲硫酸鹽、二氯酚吡啶酚、鐵氰化合物、四唑鎢鹽等適當選擇 1 種或 2 種以上使用，特別以輔酶 NADP 為佳。電子接受體之使用濃度以 0.1 至 10 毫莫耳/公升，特別是 0.5 至 2 毫莫耳/公升範圍為佳。

同時，為定量電子接受體之還原體，可以併用會受電子接受體的還原發色之發色劑。此發色劑可依使用之電子接受體適當地選擇，其例可舉如輔酶 NADP 還原體 NADPH 之定量，可以以吩嗪甲硫酸鹽或心肌酶及四唑鎢鹽共存，此色定量生成之甲臍色素之方法。

此外，本發明使用之甘露糖脫氫酶，因亦可作用甘露糖以外之葡萄糖，特別在測定血清或血漿等生物樣品中之甘露糖時，多少會受到葡萄糖的影響。因此，為提高對生物樣品之測定精密度，以併用葡萄糖消除劑為佳。此種葡萄糖消除劑最好用含葡萄糖 6 位磷酸化酵素及 ATP 者。

上述之葡萄糖 6 位磷酸化酶可例舉如葡萄糖激酶、己糖激酶等，即只要為分類為 EC 2.7.1.2、EC 2.7.1.1 者即可並無特別限制，亦可以使用市售商品，而最好使用對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

葡萄糖專一性高之葡萄糖激酶。其使用量依樣品中之葡萄糖量而異，大約為 0.1 至 50u/ml。另外，葡萄糖磷酸化所需之 ATP 量，則依樣品中之葡萄糖量而異，但大約為 1 至 20mM。同時，為另再促進葡萄糖磷酸化反應，通常其中含 5 至 50mM 程度之無機、有機鹽類之鎂離子。消除葡萄糖之葡萄糖磷酸化反應，則在 pH6 至 10 之緩衝液中，在 20 至 25℃，或更好在 25 至 37℃ 下，添加後開始反應 10 分鐘程度。

本發明中使用之緩衝液為 pH6 至 10 之磷酸緩衝液，甘胺酸緩衝液，Tris 鹽酸緩衝液、古德氏(Good's Buffer)緩衝液，硼酸緩衝液等，即可使用一般使用之物。

本發明之甘露糖定量用試劑，亦可將各別葡萄糖消除劑，及定量用酵素組合。更具體地，即最好由含電子接受體及葡萄糖消除劑之第一試劑，與含甘露糖脫氫酶之第二試劑二個試劑組成。

生物樣品在添加上述甘露糖定量用試劑反應後，反應液中還原電子接受體之測定，可以以例如電子接受體之還原體特有之吸收波長測定吸光度、或由電子接受體之還原體發色之發色劑的發色強度測定等測定。

[實施例]

以下即舉實施例具體說明本發明，但本發明並不限定於此。

酵素製造例 (由 Gluconobacter asaii 來之己醛糖脫氫酶之製造)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

Gluconobacter asaii(IFO 3276)接菌入含 0.5%酵母萃取物、1%果糖之培養基中，於 28℃ 下振盪培養 24 小時，再離心分離即得到菌體。該菌體再懸浮於 20mM 磷酸緩衝液(pH7)中，再於冰浴下經超音波破菌裝置處理，離心分離破菌菌液，除去菌體殘渣，即可得到粗酵素液。

該粗酵素液中再加入硫酸銨粉末溶解成飽和度 30%，再離心分離析出之蛋白質並去除。得到之上清液通過 Butyl Toyo Pearl 管柱吸著酵素，再以含 30 至 0%飽和量硫酸銨之 20mM 磷酸緩衝液(pH7)溶出酵素。

測定各溶出區分之酵素活性後回收活性區分，將該活性區分經 20mM 磷酸緩衝液(pH7)透析脫鹽後，再通過 DEAE Toyo Pearl 管柱吸著酵素，以含 0 至 0.25M 之 NaCl 的 20mM 磷酸緩衝液(pH7)溶出酵素。

測定各溶出區分之酵素活性後回收活性區分，該活性區分再經 20mM 磷酸緩衝液(pH7)透析脫鹽後，再經羧基磷灰石管柱吸著酵素，再以 20 至 150mM 磷酸緩衝液(pH7)溶出酵素，測定各溶出區分之酵素活性後回收活性區分，即得精製酵素液。

實施例 1

以上述酵素製造例中得到之己醛糖脫氫酶，與電子接受體之輔酶 NADP，配成含以下所示第一試劑及第二試劑之定量用試劑。

• 第一試劑(pH8.5)：

125mM Tris 鹽酸緩衝液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (8)

1.25mM NADP

0.75mM WST-1(同仁化學研究所股份有限公司製造)

1.25% Tween 20(Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate)

6.25u/ml 心肌黃酶

• 第二試劑(pH7.0):

20mM 磷酸緩衝液

23u/ml 己醛糖脫氫酶

之後，再以該試劑，依以下所示測定各種濃度(0至50 μ g/ml)之甘露糖溶液。

對各種濃度之甘露糖溶液各8 μ l，添加256 μ l之第一試劑後在37℃下反應5分鐘後，其次添加56 μ l之第二試劑，同樣在37℃下反應5分鐘後，以主波長450nm，副波長700nm之二波長，測定二點測定之吸光度。此操作，悉以日立7150型自動分析裝置操作。該結果示於第1圖。

由第1圖可知，甘露糖濃度0至50 μ g/ml，可得到成直線之發色吸光度，因此可正確地定量低濃度範圍下之甘露糖。

實施例 2(以配合葡萄糖消除劑之試劑組定量甘露糖)

以上述酵素製造例中所得之己醛糖去氫酶與電子接受體之輔酶 NADP，及葡萄糖消除劑葡萄糖激酶及 ATP，依以下所示配成含第一試劑及第二試劑之定量用試劑。

• 第一試劑(pH8.5):

125mM Tris 鹽酸緩衝液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (9)

1.25mM NADP

0.75mM WST-1(同仁化學研究所股份有限公司製)

1.25% Tween 20(Polyoxyethylene (20) Sorbitan
Monolaurate)

6.25u/ml 心肌黃酶

12.5u/ml 葡萄糖激酶

10mM ATP

2mM 醋酸鎂

• 第二試劑(pH7.0):

20mM 磷酸緩衝液

23u/ml 己醛糖脫氫酶

之後，與實施例 1 相同地，以該試劑與各種濃度(0 至 50 μ g/ml)之甘露糖溶液反應，再測定反應液之吸光度。該結果如第 2 圖所示。

其次，上述試劑，再與一定濃度(約 10 μ g/ml)之甘露糖，及含各種濃度(0 至 1.000mg/dl)葡萄糖之溶液反應，測定反應液之吸光度。該結果如第 3 圖所示。

由第 2 圖可知，甘露糖濃度 0 至 50 μ g/ml，可得直線之發色吸光度，可知配合葡萄糖消除劑之試劑組可以正確地定量甘露糖。

另外，由第 3 圖可知，樣品中葡萄糖濃度改變至 0 至 1,000mg/dl 時，對甘露糖濃度亦可得到一定之吸光度。由此可知，在含高濃度葡萄糖的樣品中，亦可以正確地定量樣品中之甘露糖。

五、發明說明 (10)

實施例 3

對 9 容積之 5 種血清(血清 1 至 5)，調製添加有 1 容積比例之 100 μ g/ml 甘露糖水溶液的樣品，及以精製水取代甘露糖水溶液之對照樣品，再以實施例 2 之試劑測定甘露糖。該測定值再以實施例 2 中所得之檢量線，定量甘露糖，算出添加甘露糖理論量(10 μ g/ml)之回收量。此結果如表 1 所示。

[表 1]

	添加甘露糖水溶液(①) (μ g/ml)	精製水(②) (μ g/ml)	①-② (μ g/ml)
血清 1	15.4	5.6	9.8
血清 2	15.4	6.1	9.2
血清 3	16.9	7.3	9.6
血清 4	19.5	9.9	9.6
血清 5	13.9	4.4	9.5

由表 1 可知，對添加甘露糖之理論量(10 μ g/ml)，添加回收率良好，因此可以正確定量血清中之甘露糖。

6.發明之效果

如上述說明，本發明對含甘露糖之樣品，以添加電子接受體，再經甘露糖脫氫酶作用，由甘露糖脫氫酶直接作用甘露糖，即會氧化甘露糖，同時直接還原電子接受體，因此，可以由測定生成之電子接受體的還原體，高靈敏度且正確地定量甘露糖。同時，因反應系簡單，亦容易適用於各種自動分析裝置，適於處理大量之檢體。

同時，併用葡萄糖消除劑可減少樣品中同時存在之葡

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (11)

萄糖，葡萄糖之影響幾乎可達到可忽視程度，因此對血清或血漿等生物樣品亦可以簡單之操作作高精密度之測定。

7.圖面之簡單說明

第 1 圖為表示以含電子接受體之第一試劑，及含己醛糖脫氫酶之第二試劑，測定各種濃度的甘露糖溶液之結果的圖表。

第 2 圖所示之圖表，為以含電子接受體及葡萄糖消除劑之第一試劑、及含己醛糖去氫酶之第二試劑，測定各種濃度之甘露糖溶液的結果。

第 3 圖所示之圖表，為以含電子接受體及葡萄糖消除劑之第一試劑，及含己醛糖去氫酶之第二試劑，測定在添加有改變濃度之葡萄糖的濃度一定之甘露糖溶液的結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

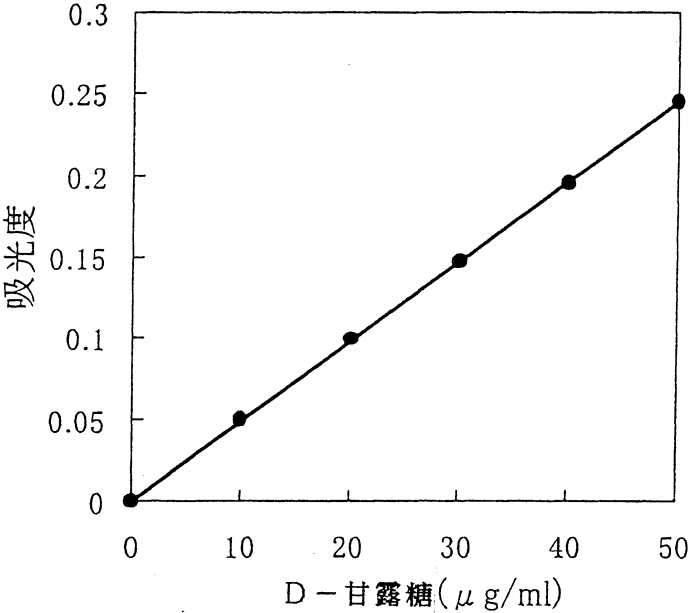
線

四、中文發明摘要（發明之名稱：甘露糖之定量方法及定量用試劑）

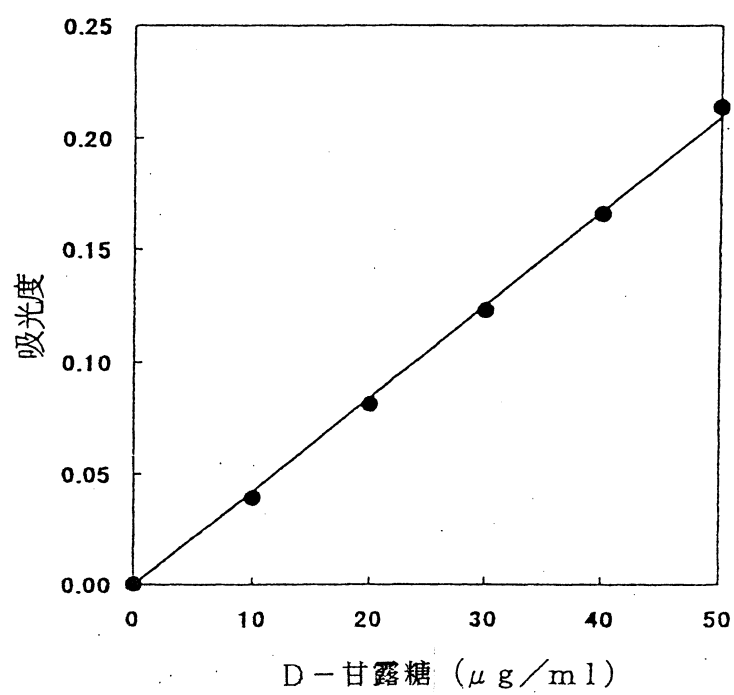
本發明為關於一種正確且簡便之酵素法甘露糖定量法及定量用試劑。

英文發明摘要（發明之名稱：QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD OF MANNOSE AND REAGENT THEREFOR）

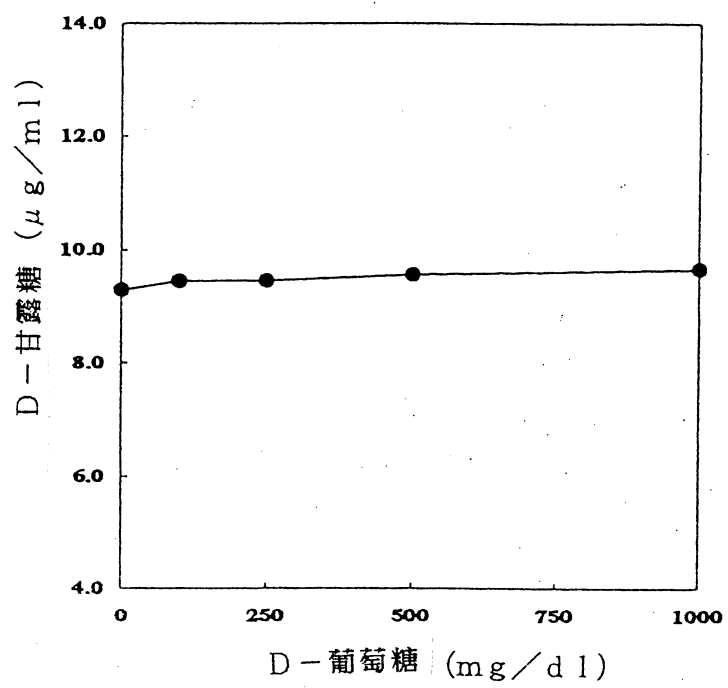
Disclosed are a method for quantitatively determining mannose, which comprises reacting mannose in a specimen with an enzyme which is capable of oxidizing the mannose by dehydrogenation, in the presence of an electron acceptor, and quantitatively determining a formed reductant of the electron acceptor; and a reagent for the quantitative determination of mannose.



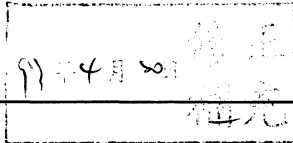
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



第 89122210 號專利申請案

申請專利範圍修正本

(93 年 4 月 20 日)

1. 一種甘露糖定量法，其特徵為對於生物樣品中或由該生物樣品所製備樣品中之甘露糖，在電子接受體存在下，使其與分類為酵素號碼 EC1.1.1.119 之酵素作用，而測定該作用中所生成之還原型電子接受體的量。
2. 如申請專利範圍第 1 項之甘露糖的定量法，其中，在上述樣品中除了該甘露糖外亦含葡萄糖，而以葡萄糖消除劑使上述樣品中之葡萄糖改變為不與上述酵素反應之構造後，再與上述酵素作用。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之甘露糖的定量法，其中，上述分類為酵素號碼 EC1.1.1.119 之酵素為源自 Gluconobacter 屬微生物之己醛糖脫氫酶。
4. 如申請專利範圍第 2 項之甘露糖定量法，其中，上述葡萄糖消除劑為含葡萄糖 6 位磷酸化酵素及腺嘌呤三磷酸。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之甘露糖定量法，其中，上述電子接受體為輔酶氧化型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。
6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之甘露糖定量法，其中，上述生物樣品為選自血液、血清、血漿、骨髓液及尿之群中的一種。
7. 一種甘露糖定量用試劑，其特徵為在電子接受體存在

下，用於定量生物樣品中或由該生物樣品所製備樣品中之甘露糖之定量用試劑中，含有分類為酵素號碼 EC1.1.1.119 之酵素以及該酵素可以利用之上述電子接受體。

8. 如申請專利範圍第 7 項記載之甘露糖定量用試劑，其中，另再含葡萄糖消除劑。
9. 如申請專利範圍第 7 或 8 項之甘露糖定量用試劑，其中，上述分類為酵素號碼 EC1.1.1.119 之酵素為源自 Gluconobacter 屬微生物之己醛糖脫氫酶。
10. 如申請專利範圍第 8 項之甘露糖定量用試劑，其中，上述葡萄糖消除劑含葡萄糖 6 位磷酸化酵素及腺嘌呤三磷酸。
11. 如申請專利範圍第 7 或 8 項之甘露糖定量用試劑，其中，上述電子接受體為輔酶氧化型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。