



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94117174.4

[51]Int.Cl⁶

C12Q 1/40

[43]公开日 1995年8月2日

[22]申请日 94.10.19

[30]优先权

[32]93.10.20 [33]JP [31]262727 / 93

[32]94.5.11 [33]JP [31]097214 / 94

[71]申请人 龟甲万株式会社

地址 日本千叶县

共同申请人 第一化学药品株式会社

[72]发明人 内田理一 德武昌一 山次信幸

本山义刚 细井健二

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李 瑛

C12Q 1/00 C07H 3/08

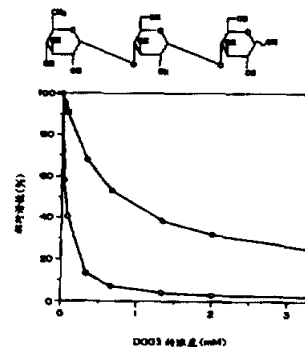
说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 α -淀粉酶同工酶活性的差示测定法

[57]摘要

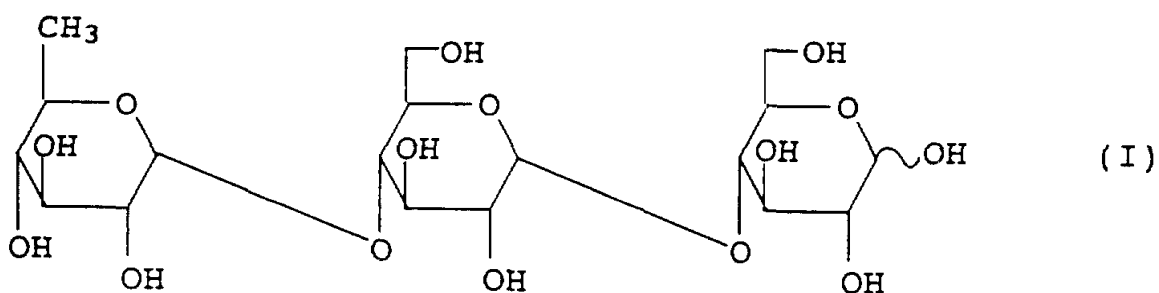
一种用抑制剂法对 α -淀粉酶同工酶活性进行差示测定的方法,其中用上式所示的 6³-脱氧麦芽三糖 (DOG3) 作为抑制剂。



(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种 α -淀粉酶同工酶活性的差示测定法，该方法是利用通过将用于测定 α -淀粉酶活性的底物与样品反应而得到的 α -淀粉酶活性测定值和通过将同样的底物与样品在抑制剂存在下反应而得到的 α -淀粉酶活性测定值，该抑制剂对两种 α -淀粉酶同工酶具有不同的抑制常数，该方法包括用下式所示的 6³-脱氧麦芽三糖 [O-6-脱氧- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖] 作为抑制剂：



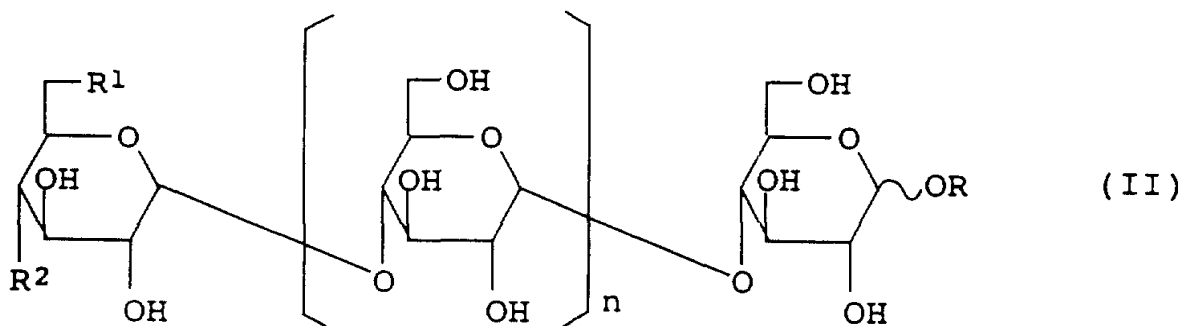
2. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的 α -淀粉酶是人 α -淀粉酶，两种 α -淀粉酶同工酶是衍生于胰液的 α -淀粉酶和衍生于唾液腺的 α -淀粉酶。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中式 (I) 所示的 6³-脱氧麦芽三糖在 α -淀粉酶活性测定体系中的浓度为 0.01—10mM。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的差示测定法是双动力

学法或双道法。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中所说的用于测定 α -淀粉酶活性的底物是下列通式所示的麦芽低聚糖衍生物：



其中 R 代表氢原子，芳香生色基团或除葡萄糖之外的糖基， R^1 和 R^2 可以是相同的或不同的，代表卤原子，羟基，叠氮基，酰氧基，烷氧基，芳氧基，烷基磺酰基，芳基磺酰基，烷基巯基，芳基巯基， N -烷基氨基甲酰氧基， N -芳基氨基甲酰氧基，烷氧甲氧基或芳氧甲氧基，或 R^1 和 R^2 一起形成取代的或未取代的亚甲基二氧基， n 表示 1-6 的整数。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中所说的通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物是麦芽五糖，麦芽七糖，2-氯-4-硝基苯基 β -D-麦芽五糖苷，2-氯-4-硝基苯基 4⁵, 6⁵-二-O-(N -乙基)氨基甲酰- β -D-麦芽五糖苷，2-氯-4-硝基苯基 4⁵, 6⁵-二-O-甲氧甲基- β -D-麦芽五糖苷，2-氯-4-硝基苯基 6⁵-叠氮基-6⁵-脱氧- β -D-麦芽五糖苷，2-氯-4-硝基苯基 6⁷

—氯—6⁷—脱氧— β -D—麦芽七糖苷, 2—氯—4—硝基苯基 α -D—麦芽三糖苷, 4—硝基苯基 6⁵-O—苄基— α -D—麦芽五糖苷, 2—氯—4—硝基苯基 4⁵, 6⁵-O—亚苄基— β -D—麦芽五糖苷, 酚酞—3'—氯苯基 6⁵-O—甲苯磺酰— β -D—麦芽五糖苷, 6⁵-氯—6⁵-脱氧—D—麦芽五糖或 1-(4⁶-O, 6⁶-O—二甲磺酰— α -麦芽六糖基)— α -D—葡糖醇。

7. 根据权利要求 6 的方法, 其中所说的通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物是 2—氯—4—硝基苯基 6⁵-叠氮基—6⁵-脱氧— β -D—麦芽五糖苷或 2—氯—4—硝基苯基 β -D—麦芽五糖苷。

8. 根据权利要求 5 的方法, 其中衍生于人胰液的 α -淀粉酶和衍生于人唾液腺的 α -淀粉酶之间的反应速率与所说的底物之比为 0.6 或更大。

说 明 书

α -淀粉酶同工酶活性的差示测定法

本发明涉及一种新的 α -淀粉酶同工酶活性的差示测定法,更具体地说涉及一种通过使用一种新的抑制剂的抑制剂方法简易而精确地测定样品中的 α -淀粉酶同工酶活性的差示法。

已知人 α -淀粉酶一般包括两种同工酶,一种来自胰脏(以下称为P型 α -淀粉酶),另一种来自唾液腺(以下称为S型 α -淀粉酶)。

当血清中总的 α -淀粉酶活性水平高时怀疑是急性胰腺炎早期或慢性胰腺炎严重,这主要是由P型 α -淀粉酶活性增加引起的。然而,在患有唾液腺或腮腺疾病时,在手术后以及在某些肝病中也观察到总 α -淀粉酶活性的剧增,这主要是由于S型 α -淀粉酶活性的增加,这样可能经常导致误诊。因此,这些年来一直迫切需要一种差示测定这些同工酶的简单而精确的方法。

到目前为止已知的人 α -淀粉酶同工酶活性的差示测定法有,例如(1)电泳法,(2)凝胶过滤法,(3)酶免疫测定(EIA)法,或(4)使用抑制剂如麦芽抑制剂的抑制剂法。

在这些方法中,方法(1)-(3)的缺陷在于测定操作复杂且耗

时。

另一方面，使用麦芽抑制剂的抑制剂法(4)是通过利用下列事实来测定 *P* 型和 *S* 型淀粉酶的活性，即所说的麦芽抑制剂对 *S* 型 α -淀粉酶的抑制强于对 *P* 型 α -淀粉酶的抑制，换句话说，这些抑制作用对这些淀粉酶具有不同的抑制常数。这种操作相对简单的方法这些年来一直广泛使用。

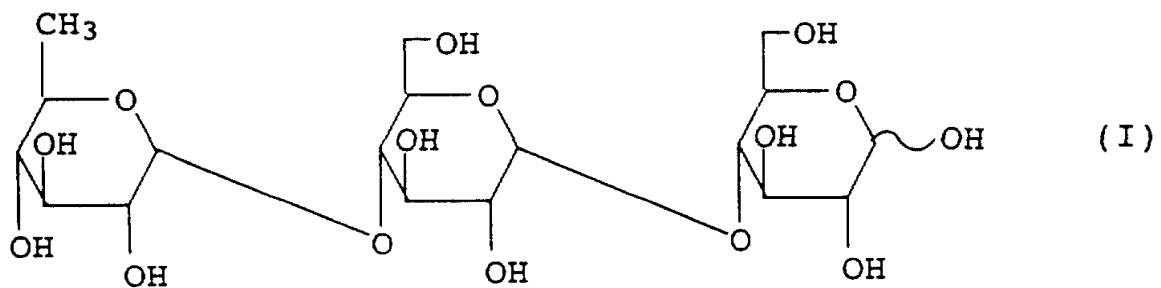
然而，麦芽抑制剂是一种蛋白质，因而稳定性差。这给长期贮存用于测定 α -淀粉酶同工酶活性的试剂盒带来困难。再者，麦芽抑制剂还有一个缺点，就是必须对每一试剂盒中麦芽抑制剂的抑制常数进行测定，因为针对 α -淀粉酶同工酶的麦芽抑制剂具有不同的抑制常数，这取决于它们的纯度。

为了克服常规抑制剂方法中存在的缺陷和提供一种以简单的操作和高精确性有效地测定 α -淀粉酶同工酶活性的方法，完成了本发明。

本发明人为了实现上述目的已进行了各种研究。结果发现 6³-脱氧麦芽三糖对 *P* 型 α -淀粉酶和对 *S* 型 α -淀粉酶的抑制常数之间存在很大的差别，使用上述材料作为抑制剂可以成功地完成用抑制剂法对 α -淀粉酶同工酶进行的差示测定。因此在这些发现的基础上完成了本发明。

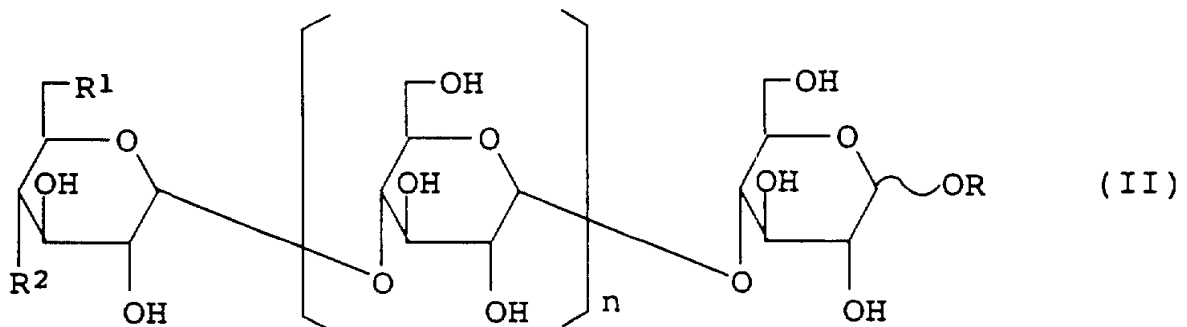
也就是说，本发明旨在提供一种 α -淀粉酶同工酶活性的差示定量测定法，该方法是利用通过将用于测定 α -淀粉酶活性的底物

与样品反应而得到的 α -淀粉酶活性测定值和通过将同样的底物与样品在抑制剂存在下反应而得到的 α -淀粉酶活性测定值,该抑制剂对两种 α -淀粉酶同工酶具有不同的抑制常数,在所谓的抑制剂方法中用下式所示的6³-脱氧麦芽三糖[O-6-脱氧- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖)作为抑制剂:



下面对本发明进行详述。

首先,在本发明中用于测定 α -淀粉酶活性的底物可以是能够测定 α -淀粉酶活性的任何底物,例如包括下式所示的麦芽低聚糖衍生物:



其中 R 代表氢原子, 芳香生色基团或除葡萄糖之外的糖基, R^1 和 R^2 可以是相同的或不同的, 代表卤原子, 羟基, 叠氮基, 酰氧基, 烷氧基, 芳氧基, 烷基磺酰基, 芳基磺酰基, 烷基巯基, 芳基巯基, N -烷基氨基甲酰氧基, N -芳基氨基甲酰氧基, 烷氧甲氧基或芳氧甲氧基, 或 R^1 和 R^2 一起形成取代的或未取代的亚甲基二氧基, n 代表 1—6 的整数。

在这些材料中, P 型和 S 型 α -淀粉酶与底物的反应速率之比至少为 0.6, 尤其是大约为 1 在简易性和精确性方面较有利。

同样, 用作抑制剂的式(I)所示的 6^3 -脱氧麦芽三糖基本上不被 α -淀粉酶水解或甚至不被偶合酶水解, 如有必要, 在测定 α -淀粉酶活性时偶合酶可存在, 具体地说, 偶合酶特别抑制 P 型 α -淀粉酶。因此, 对 P 型和 S 型 α -淀粉酶的抑制常数差别很大。此外, 这种材料不同于其它的蛋白质如麦芽抑制剂, 它是高度稳定的, 因此它能够长期贮存并且当将其掺加到试剂盒中时能够有效地用于测定 α -淀粉酶同工酶活性。

下面, 具体说明差示测定样品中的 α -淀粉酶同工酶活性的方法。

用常规方法(见下面的实施例), 分别用具有已知活性的 P 型和 S 型 α -淀粉酶制剂与用于测定 α -淀粉酶活性的底物反应首先得到反应速率常数(K_p , K_s)。

同样, 将用作抑制剂的 6^3 -脱氧麦芽三糖以各种浓度加入到

与上面相同的用于测定 α -淀粉酶活性的底物中，确定 6^3 -脱氧麦芽三糖对上述 P 型和 S 型 α -淀粉酶制剂的抑制常数差别最大时的浓度，在此浓度下对 P 型和 S 型 α -淀粉酶的抑制常数 (a, b) 可用常规方法得到 (见下面的实施例)。

接着，将上述用于测定 α -淀粉酶活性的底物加入到用于测定 α -淀粉酶活性的样品中。用常规方法在偶合酶存在或不存在的条件下进行混合物的反应并测定可变吸收度 (T)。

然后以上述相同方式，但加入上述确定浓度的 6^3 -脱氧麦芽三糖测定可变吸收度 (W)。

在这一点上， P 型 α -淀粉酶活性 (P) 和 S 型 α -淀粉酶活性 (S) 之间存在下列关系：

$$K_p P + K_s S = T \quad (1)$$

$$(1-a)K_p P + (1-b)K_s S = W \quad (2)$$

从这些关系可得到下列公式：

$$P = [(1-b)T - W] / [K_p(a-b)] \quad (3)$$

$$S = (T - K_p P) / K_s \quad (4)$$

也就是说，如果预先测定 K_p , K_s , a 和 b ，则能够通过使用测定 α -淀粉酶活性的底物和相同的底物及 6^3 -脱氧麦芽三糖，和通过用酶与样品的反应中所测得的可变吸收度 (T, W) 代替式 (3) 和 (4) 中的 T 和 W 容易地进行样品中两种同工酶活性的差示测定。

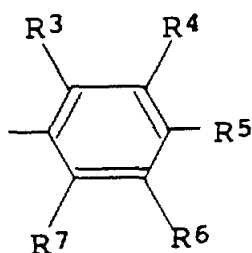
在本发明的方法中所用的式 (I) 所示的 6^3 -脱氧麦芽三糖既可

以是 α -异头物也可以是 β -异头物。

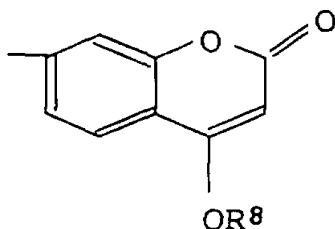
同样，用作测定 α -淀粉酶活性底物的式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物既可以是 α -异头物也可以是 β -异头物。而且，作为麦芽低聚糖部分，例如包括麦芽三糖至麦芽八糖，所有这些都可使用，特别优选的是麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖。

通式(II)中的基团 R 代表氢原子，芳香生色基团或除葡萄糖外的单糖部分，特别优选的是芳香生色基团。

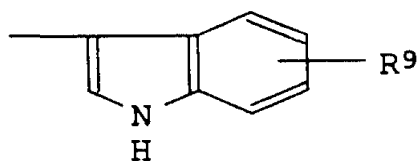
作为芳香生色基团，可以使用任何分光镜法可检测的基团，例如包括下列基团：



其中 R^3-R^7 可以是相同的或不同的，代表氢原子，卤原子，硝基，烷基，芳基，烯丙基，氨基，磺酸或羧基，或 R^3 和 R^4 或 R^4 和 R^5 可以键合起来形成稠合的芳环，

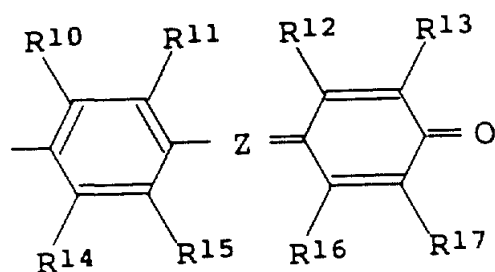


其中 R^8 代表氢原子或烷基，



其中 R^9 代表氢原子或烷基，

和



其中 $R^{10}-R^{17}$ 可以是相同的或不同的，代表氢原子，卤原子，硝基，烷基，芳基，烯丙基，氨基，磺酸或羧基，或 R^{10} 和 R^{11} 或 R^{12} 和 R^{13} 可以键合起来形成稠合的芳环，或 R^{11} 和 R^{12} 和/或 R^{15} 和 R^{16} 可代表形成稠合醚环的共用氧原子， Z 代表氮原子或基团 $N \rightarrow O$ 。

此外，除葡萄糖外的单糖可以是广义上的单糖或其衍生物，例如包括果糖，肌醇，葡糖醇，山梨糖醇和葡糖-6-磷酸。

通式(II)所示的化合物的典型实例包括麦芽五糖，麦芽七糖，2-氯-4-硝基苯基 β -D-麦芽五糖苷，2-氯-4-硝基苯基 $4^5, 6^5$ -二-O-(N-乙基)氨基甲酰- β -D-麦芽五糖苷，2-氯-4-硝基苯基 $4^5, 6^5$ -二-O-甲氧甲基- β -D-麦芽五糖苷，2-氯-4-硝基苯基 6^5 -叠氨基- 6^5 -脱氧- β -D-麦芽五糖苷，

2-氯-4-硝基苯基 6⁷-氯-6⁷-脱氧-β-D-麦芽七糖苷, 2-氯-4-硝基苯基 α-D-麦芽三糖苷, 4-硝基苯基 6⁵-O-苄基-α-D-麦芽五糖苷, 2-氯-4-硝基苯基 4⁵, 6⁵-O-亚苄基-β-D-麦芽五糖苷, 酚胺-3'-氯苯基 6⁵-O-甲苯磺酰-β-D-麦芽五糖苷, 6⁵-氯-6⁵-脱氧-D-麦芽五糖, 1-(4⁶-O, 6⁶-O-二甲磺酰-α-麦芽六糖基)-α-D-葡糖醇等等。

在本文中, 符号 6⁵, 6⁷, 6^m 和 4^m 是指在构成麦芽低聚糖衍生物的葡萄糖单元中从还原末端起第 5 位, 第 7 位或第 *m* 位上的 6-羟基或 4-羟基被取代。

此外, 式 (I) 的 6³-脱氧麦芽三糖是一种已知的材料(见 *Carbohydrate Res.*, 51, 73-84(1976)), 可以用任何方法制备。例如, 目的物 6³-脱氧麦芽三糖可如下制备: 用 *Carbohydr. Res.*, 238, 193-213 (1993) 中所述的方法使 α-环糊精单甲苯磺酰化, 使该甲苯磺酰基衍生物与氢硼化钠反应, 生成单-6-脱氧-β-环糊精, 后者在与环糊精酶(见日本专利公开 No. 3-15384) 反应过程中或之后与端解型糖化酶如葡糖淀粉酶或 α-葡糖苷酶, 衍生于曲霉属的 α-淀粉酶等等反应, 进而用常规的纯化方法处理产物。再者, 所说的 6³-脱氧麦芽三糖可结合各种合成方法进行制备(见 *J. Biochem.* 84, 835-842 (1978))。

此外, 作为通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物, 可以直接使用市售产品或通过适当结合通常的制备方法而制得的产品[例如见日

本专利公开 Nos. 5-1091, 6-56869, 60-78994 和 4-346994, 以及 *Carbohydrate Research*, 238, 109-133 (1993)]。

在本发明的方法中, 在作为定量测定 α -淀粉酶同工酶活性的 α -淀粉酶抑制剂的式(I)所示的 6³-脱氧麦芽三糖存在或不存在下, 用通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物作为测定 α -淀粉酶活性的底物测定 α -淀粉酶活性。在这种情况下, 一般是在偶合酶存在下使 α -淀粉酶和底物反应, 底物与偶合酶之间的关系不受特定限制, 可以象往常一样。如下所述, 对于某些底物, 不需要偶合酶。

例如, 可提及的作为底物的通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物和偶合酶的结合如下:

- (1) 当 n 表示 1 和 OR 代表 α -异头物时, 不需要偶合酶;
- (2) 在 n 表示 2 或更多和 R 代表氢原子的化合物(α -异头物和/或 β -异头物)中, 使用 α -葡糖苷酶和/或葡糖淀粉酶;

(3) 在 R 代表芳香生色基团或除葡萄糖外的单糖部分的化合物中,

(i) 就单独的 α -异头物而言, 使用 α -葡糖苷酶和/或葡糖淀粉酶; 和

(ii) 就单独的 β -异头物或 α -异头物和 β -异头物的混合物而言, 除了使用 α -葡糖苷酶和/或葡糖淀粉酶之外还使用 β -葡糖苷酶。

在这一点上, 当使用其中非还原末端是具有 R¹ 和 R² 代表的

羟基的化合物的通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物作为底物时,象往常一样不使用作为偶合酶的葡糖淀粉酶。

在此所用的 α -葡糖苷酶可以是衍生于动物、植物或微生物的任何一种,优选使用的是衍生于酵母的 α -葡糖苷酶。同样,葡糖淀粉酶也可衍生于任何来源,例如,优选的是衍生于根霉菌种的葡糖淀粉酶。此外,也可使用衍生于任何来源的 β -葡糖苷酶,例如,使用得自于杏仁的 β -葡糖苷酶。

其次,作为对定量测定 α -淀粉酶同工酶活性有利的体系,可提到的有这样的体系,该体系包括作为底物的通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物,其用量为0.1—10mM;缓冲剂,其用量为2—300mM;如果需要偶合酶,则包括 α -葡糖苷酶和/或葡糖淀粉酶,其用量分别为5—1,000单位/ml;和 β -葡糖苷酶,其用量为0.5—30单位/ml,由于所说的底物和偶合酶结合,该体系的pH为4—10。

同样,对于作为抑制剂掺入测定 α -淀粉酶活性的体系中的式(I)所示的6³-脱氧麦芽三糖的浓度,使用的是对P型 α -淀粉酶与S型 α -淀粉酶的抑制常数之间差别最大的浓度,该浓度一般为0.01—10mM,优选0.05—5mM。

作为所用的缓冲剂,可以提到的有,例如,磷酸盐、乙酸盐、碳酸盐、Good缓冲剂、硼酸盐、柠檬酸盐或二甲基葡糖酸盐。

如有必要,除了上述组分外还可将多种常规的添加剂加入到

这样的体系中，只要不削弱本发明的目的即可。例如，可以加入甘油、牛血清白蛋白、 α -或 β -环糊精、或 Triton X-100 作为助溶剂和稳定剂，并且可以加入各种离子如以 NaCl , MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 或 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 形式存在的 Cl^- , Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 作为人 α -淀粉酶活化剂。这些添加剂可以单独加入或将两种或多种添加剂联合加入。这些组分可以在体系制备过程中的合适步骤加入。

当使用 R 代表氢原子或单糖部分的通式 (II) 所示的麦芽低聚糖作为底物时，可用分光镜法对经酶促反应生成的葡萄糖、麦芽糖或其它的单糖进行定量测定，即，加入在参与 $\text{NAD(P)} \rightarrow \text{NAD(P)H}$ 或 $\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{NAD(P)}$ 的氧化-还原反应的测定系统中常用的酶如葡糖-6-磷酸脱氢酶(例如衍生于肠系膜明串珠菌的葡糖-6-磷酸脱氢酶)，麦芽糖磷酸化酶(例如衍生于短乳杆菌的麦芽糖磷酸化酶)，己糖激酶(例如衍生于 酵母的己糖激酶)， β -磷酸变位酶(例如衍生于兔肌肉的 β -磷酸变位酶)，山梨糖醇脱氢酶(例如衍生于羊肝脏的山梨糖醇脱氢酶)， NAD(P) [或 NAD(P)H] 和 ATP 。

更优选的是使用 R 为芳香生色基团的式 (II) 的麦芽低聚糖作为底物，因为不是必须使用所说的酶并且可以应用吸收度法。

在附图中，

图 1 是表明在本发明方法的实施例 1 中，作为抑制剂的 6³-脱氧麦芽三糖 (DOS3) 的各种不同浓度与 P 型和 S 型 α -淀粉酶的

相对活性之间的关系示意图，

图 2 是表明按照本发明的方法对 P 型 α -淀粉酶活性的测定值与按照麦芽抑制剂法对 P 型 α -淀粉酶活性的测定值之间相关性的示意图，

图 3 是表明按照本发明方法中的 2-氯-4-硝基苯基 6⁵-叠氮基-6⁵-脱氧- β -D-麦芽五糖苷(N3G5CNP)法对 P 型 α -淀粉酶活性的测定值与按照 2-氯-4-硝基苯基 β -D-麦芽五糖苷(G5CNP)法对 P 型 α -淀粉酶活性的测定值之间相关性的示意图，和

图 4 是表明按照双道法(*the two channel method*)对 P 型 α -淀粉酶活性的测定值与按照本发明方法中的双动力学法(*the double kinetic method*)对 P 型 α -淀粉酶活性的测定值之间相关性的示意图。

现在参照优选的实施方案来说明本发明的方法。

首先，用通式(II)所示的麦芽低聚糖衍生物作为底物并使用具有已知活性的 P 型和 S 型 α -淀粉酶制剂，按照常规的方法测定反应速率常数(K_p , K_s)。

同样，使用具有已知活性的 P 型和 S 型 α -淀粉酶制剂，将式(I)所示的 6³-脱氧麦芽三糖以不同的浓度加入到相同的底物中以测定对上述 P 型和 S 型 α -淀粉酶活性的抑制剂之间的抑制常数差别最大时的浓度，在该浓度下对 P 型和 S 型 α -淀粉酶的抑制

常数(a, b)可用常规方法测得。

其次，差示测定法包括双道法(二次测定法)和双动力学法(一次测定法，同时做两项分析)，现在解释前一种方法。

根据需要，向具有 α -淀粉酶活性的样品中加入作为偶合酶的 α -葡糖苷酶和/或葡糖淀粉酶，用量为5—1,000单位/ ml ，优选的是10—500单位/ ml 。如果底物含有 β -异头物，则应进一步加入0.5—30单位/ ml ，优选1—15单位/ ml 量的 β -葡糖苷酶。与此同时或在此之后，与缓冲剂一起加入0.1—10 mM ，优选0.3—5 mM 的底物，在温度为25—45 $^{\circ}C$ ，优选35—40 $^{\circ}C$ ，和 pH 值为4—10，优选6.5—7.5的条件下使混合物反应至少1分钟，优选2—10分钟。所得到的芳香生色化合物的吸收度(T)的变化可在适宜的波长下直接测定或在调节 pH 之后连续或间歇测定。

同样，可变吸收度(W)也可用与上面相同的方法测定，不同的是将抑制剂加入到与上面相同的底物中，其浓度使测定系统中 P 型和 S 型淀粉酶的抑制常数差别最大。

就后一种方法而言，可变吸收度(T')可用与上面相同的方法测定，将所说的抑制剂以使抑制常数差别最大的浓度加入到测定系统中，测定可变吸收度(W)。

在这种情况下， T 用下列公式表示：

$$T = T' \times (T' \text{测定时的总液体量} / W \text{测定时的总液体量})$$

在这一点上，可将抑制剂直接加入到底物溶液或测定系统中

或者也可将抑制剂加入到所用的偶合酶中。

对于 R 代表氢原子或单糖部分的通式(II)所示的化合物来说,在加入与吸收度体系有关的酶和其它必不可少的组分以后,按照与 R 为芳香生色基团时相同的方法进行操作。

所得到的值可替代公式(3)和(4)中的 K_p , K_s , a , b , T 和 W , 从而可得到 P 型 α -淀粉酶活性(P)和 S 型 α -淀粉酶活性(S)。

在本发明中用作抑制剂的式(I)所示的 6^3 -脱氧麦芽三糖显示出对两种 α -淀粉酶同工酶的抑制常数之间的极大不同,因此其优点在于能够有效地进行人 α -淀粉酶同工酶活性的差示测定,与常规方法相比操作简单,精确性高。因此,本发明的方法适合于疾病诊断的测定方法,其中 P 型 α -淀粉酶和 S 型 α -淀粉酶必须单独进行定量测定。

同样,双动力学法(单测定法,同时进行两项分析)也可作为本发明的差示测定法应用。此方法是优选的,其中可按照下面的实施例所述进行测定,与双道法(双测定法)相比,样品、底物和偶合酶的用量减半,时间缩短。

现在参照实施例更详细地阐述本发明。

在实施例中, $N3G5-CNP$ 是指 2-氯-4-硝基苯基 6^5 -叠氮基- 6^5 -脱氧- β - D -麦芽五糖苷, $DOG3$ 是指 6^3 -脱氧麦芽三糖, $G5-CNP$ 是指 2-氯-4-硝基苯基 β - D -麦芽五糖苷。

同样,除非另有规定,最大吸收度的波长是在甲醇中测定的,

比旋度是在 25℃ 用 *D*-射线测定的。

信息实施例 1: *N3G5-CNP* 的制备

(1) 6-*O*-甲苯磺酰基- β -环糊精的制备

将市售的 β -环糊精 (*Wako Pure Chemical Industries, Ltd.*, 50.0g, 44.1mmol) 溶于 500ml 吡啶中, 并加入 33.3g (175mmol) 甲苯磺酰氯。在室温、搅拌下使混合物反应 4 小时。然后向反应混合物中加入 250ml 水和 1 升正丁醇, 在减压下将混合物浓缩至 1/2 体积并在搅拌下倒入 500ml 丙酮中使固体产物沉淀, 用玻璃滤器过滤并用 200ml 丙酮洗涤两次。用 *ODS* 柱层析法纯化过滤所分离的产物, 用乙醇-水混合物 (体积比 1:9) 洗脱所需级分, 将其浓缩并用水重结晶, 得到 25.3g 6-*O*-甲苯磺酰基- β -环糊精 (19.6mmol, 产率 44.4%)。

熔点(℃): 172.0—174.0 (分解)

红外光谱(cm^{-1}): 3400, 2930, 1642, 1632, 1600, 1424,
1360, 1300, 1178, 1156, 1078, 1028

NMR 谱 (200 MHz) ppm (*DMSO-d*₆): 2.44 (3H, s),
3.15 - 4.45 (m), 4.76 (2H, br.s), 4.85 (5H,
br.s), 7.44 (1H, d, *J*=8.8 Hz), 7.75 (1H, d,
J=8.8 Hz)

(2) 6-叠氮基-6-脱氧-β-环糊精的制备

将上面(1)中得到的 6-O-甲苯磺酰基-β-环糊精(16.9g, 13.1mmol)溶于 500 ml 水和 250ml 1,4-二噁烷的混合物中, 加入 34.1g (525mmol)叠氮化钠, 并在 85℃下使混合物反应 4 小时。然后在减压下将反应混合物浓缩至 1/2 体积, 用 ODS 柱层析法纯化。用乙醇-水的混合物(体积比 1:9)洗脱所需的级分, 将其浓缩并用水重结晶, 得到 14.3g 6-叠氮基-6-脱氧-β-环糊精(12.3mmol, 产率: 93.9%)。

熔点(℃): 215.0—218.0 (分解)

红外光谱(cm^{-1}): 3390, 2920, 2120, 1642, 1414, 1370, 1340, 1304, 1156, 1080, 1030

高效液相色谱

[TSK 凝胶 Amide-80 柱(4.6mmID×250mm)

Tosoh 公司生产, RI 检测仪, 洗脱剂:

乙腈/水=3:2(V/V), 流速: 1.0ml/分];

t_R =6.6 分。

比旋度 $[\alpha]$: (c 0.510, 1,4-二噁烷/ H_2O =1:1 (V/V)); +145°

$C_{42}H_{69}N_3O_{34}$ 元素分析:

	C	H	N
理论值(%)	43.49	6.00	3.62

计算值(%) 43.28 6.11 3.53

(3) 6⁵-叠氮基-6⁵-脱氧-D-麦芽五糖的制备

在搅拌下,将按照与(2)相同的方法得到的6-叠氮基-6-脱氧-β-环糊精(25g, 21.6mmol)倒入1.0升已在40℃下加热的10mM磷酸盐缓冲液(pH7.8)中并使之完全溶解。加入490单位按照下述方法得到的环糊精酶,在40℃、搅拌下使混合物反应2小时。反应毕,在80℃、搅拌下加热反应混合物10分钟。然后使反应混合物冷却至室温,用RADIOLITE(#100)和膜滤器(0.45μm)过滤,然后在减压下浓缩至115ml。所得到的浓缩物用ODS柱层析法纯化,用乙醇-水的混合物[0%(V/V)→35%(V/V)梯度]洗脱并浓缩,得到11.6g 6^m-叠氮化麦芽七糖(m=1-7的整数)(9.86mmol, 产率:45.6%)。

然后在搅拌下使产物溶入250ml 20mM乙酸盐缓冲液(pH4.5)中,进而将8mg葡糖淀粉酶[250单位, Seikagaku公司]加入到溶液中。在40℃、搅拌下使混合物反应4小时。反应毕,在90℃、搅拌下加热反应混合物20分钟。然后使之冷却至室温,经膜滤器(0.45μm)过滤并在减压下浓缩至55ml体积。所得到的浓缩物用活性炭柱层析法纯化,用乙醇-水的混合物(5%→45%梯度)洗脱,并将用大约30%乙醇洗脱的级分冻干,得到1.79g 6⁵-叠氮基-6⁵-脱氧-D-麦芽五糖(2.10mmol, 产率:21.3%)。

熔点(℃): 176.0-179.0

红外光谱(cm^{-1}): 3400, 2920, 2110, 1628, 1406, 1360,
1278, 1240, 1144, 1076, 1022

NMR 谱 (200 MHz) ppr. (D_2O): 2.80 - 4.00 (m), 4.64
(0.5 H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.23 (0.5 H, d, $J =$
3.5 Hz), 5.35 (4H, d, $J = 3.5$ Hz)

高效液相色谱[TSK 凝胶 *Amide*-80 柱(4.6mmID \times 250mm),
Tosoh 公司生产, RI 检测仪, 洗脱剂: 乙腈/水=3:2(V/V), 流
速: 1.0ml/分]: $t_R=6.9$ 分。

比旋度 $[\alpha]$: ($c0.544, \text{H}_2\text{O}$); $+169^\circ$

$\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{25}$ 的元素分析:

	C	H	N
理论值(%)	42.21	6.02	4.92
计算值(%)	42.03	6.13	4.69

(4) *N3G5*-*CNP* 的制备

将按照与(3)相同的方法得到的 6⁵-叠氮基-6⁵-脱氧麦芽
五糖(5.0g, 5.86mmol)溶于 100ml 吡啶中, 加入 50ml
(529mmol)乙酸酐, 并在室温下使混合物反应 2 天。使反应混合物
中的吡啶、乙酸酐和乙酸蒸发后, 将未经纯化的残余物溶于 30ml
二氯甲烷中, 将 556 μl (5.86mmol) 三溴化磷和 211 μl (11.7mmol)

水加入到溶液中，在室温、搅拌下使混合物反应 20 小时。向反应混合物中加入 18.6g (135mmol) 无水碳酸钾，并在室温、搅拌下使混合物反应 15 分钟。用玻璃滤器分离不溶物并用 200ml 二氯甲烷洗两次。将滤液和洗液合并，蒸发除去二氯甲烷。将未经纯化的残余物溶于 100ml 乙腈中，将 5.09g(29.3mmol)2-氯-4-硝基苯酚和 6.80g(29.3mmol)氧化银(Ag_2O) 相继加入到溶液中，并在 35℃、搅拌下使混合物反应 17 小时。使反应混合物通过玻璃滤器，固体用 50ml 二氯甲烷洗三次。将滤液和洗液合并并在减压下浓缩以除去滤液中所含的乙腈和二氯甲烷。将 300ml 二氯甲烷加入到残余物中并将混合物经棉塞过滤，然后不溶物用 200ml 0.5N 氢氧化钠水溶液洗一次，用 200ml 饱和盐水洗三次。将滤液和洗液合并，用 10g 无水硫酸钠干燥，经棉塞过滤，在减压下浓缩以除去二氯甲烷。将残余物直接悬浮于 60ml 甲醇，30ml 28%(重量)氨水和 15ml 水的混合物中，在 35℃、搅拌下使悬浮液反应 20 小时。然后在减压下浓缩反应混合物以除去反应混合物中所含的水和甲醇。所得到的残余物用 ODS 凝胶柱层析法纯化，用乙醇-水的混合物(体积比 1:4)洗脱所需的级分，浓缩并用水重结晶，得到 2.47g 所需的 N3G5-CNP(2.45mmol, 产率: 41.8%)。

熔点(℃): 130.0—135.0(分解)

紫外-可见光谱: 最大吸收波长

$$[\lambda_{\max}] \text{ (nm)} = 290 \text{ (log } \epsilon = 3.98), 227 \text{ (log } \epsilon = 3.99), 209 \text{ (log } \epsilon = 4.20)$$

红外光谱(cm^{-1}): 3410, 2930, 2110, 1584, 1520, 1484,
1274, 1150, 1078, 1024

NMR 谱 (200 MHz) ppm (DMSO-d_6): 3.05 - 3.90 (m),
4.20 - 4.55 (m), 4.74 (1H, br d, $J = 4.8$ Hz),
4.96 (1H, br d, $J = 5.4$ Hz), 5.05 (2H, d, $J =$
3.7 Hz), 5.10 (2H, d, $J = 3.7$ Hz), 5.25 (1H,
d, $J = 7.6$ Hz), 5.25 - 5.60 (m), 7.47 (1H, d,
 $J = 9.3$ Hz), 8.19 (1H, dd, $J = 9.3$ Hz, 2.7
Hz), 8.29 (1H, d, $J = 2.7$ Hz)

高效液相色谱 [TSK 凝胶 *Amide*-80 柱 (4.6mmID \times 250mm),
Tosoh 公司生产, RI 检测仪, 洗脱剂: 乙腈/水 = 3:1 (V/V), 流
速: 1.0ml/分]: $t_R = 6.7$ 分。

比旋度 $[\alpha]$: (c0.516, H_2O); $+92.4^\circ$

$\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{ClN}_4\text{O}_{27}$ 的元素分析:

	C	H	N
理论值(%)	42.84	5.29	5.55
计算值(%)	42.88	5.31	5.59

信息实施例 2: DOG3 的制备

(1) 6-脱氧- β -环糊精的制备

将信息实施例 1 第(1)段中得到的 1.27g (0.985mmol) 6-O-甲苯磺酰基- β -环糊精溶于 20ml 二甲亚砜(DMSO)中, 然后加入 384mg (10.2mmol) 氢硼化钠(NaBH_4), 并在 50°C 下使混合物反应 12 小时。接着, 将 1,000ml 水加入到反应混合物中, 用 ODS 柱层析法纯化混合物以除去 DMSO。用乙醇-水的混合物(体积比 1:9)洗脱所需的级分, 浓缩并用甲醇重结晶, 得到 839.6mg 6-脱氧- β -环糊精(0.750mmol, 产率: 76.1%)。

熔点(°C): 280.0—281.0 (分解)

红外光谱(cm^{-1}): 3370, 2920, 1152, 1080, 1020

NMR 谱 (200 MHz) ppm (DMSO- d_6): 1.20 (3H, d,

$J = 6.1 \text{ Hz}$), 2.80 - 4.05 (m), 4.84 (7H, br s)

$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{34}$ 的元素分析:

	C	H
理论值(%)	45.08	6.31
计算值(%)	44.99	6.45

(2) DOG3 的制备

在搅拌下将 15g 按照与(1)中所述相同的方法得到的 6-脱氧- β -环糊精加入到 1.0 升 100mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中并使之完全溶解。向此溶液中加入 24 单位用下述方法得到的环糊精酶,并在 40°C、搅拌下使混合物反应 48 小时。反应毕,将盐酸加入到反应混合物中以调节 pH 至大约 2.0 并使反应停止。加入氢氧化钠溶液中和混合物并使该混合物通过 ODS 柱以使未反应的 6-脱氧- β -环糊精吸附于柱上并得到洗脱的级分。反复进行此程序以处理总共 63g 6-脱氧- β -环糊精。将洗脱的级分与 1/10 体积的 100mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.5)混合后,进一步用 100mM 乙酸将其调至 pH 4.5。随后,加入 2,500 单位葡糖淀粉酶,在 40°C 下进行酶反应 8 小时,将盐酸加入到混合物中调节 pH 至大约 2.0 并使反应停止,加入氢氧化钠溶液中和反应混合物。然后使反应混合物通过活性炭柱,用 0-35% 的乙醇梯度洗脱 6-脱氧麦芽低聚糖,其中将用约 21% 乙醇洗脱的级分冻干,得到大约 1.1g 6³-脱氧-D-麦芽三糖,其纯度约 98%。红外光谱(cm^{-1}): 3400, 2950, 1690, 1146, 1042

NMR 谱 (200 MHz) ppm (D_2O): 1.28 (3H, d, $J = 6.1$ Hz), 3.17 (1H, t, $J = 8.9$ Hz), 3.29 (1H, t, $J = 8.9$ Hz), 3.50 - 4.05 (m), 4.65 (ca. 0.5H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.25 (ca. 0.5H, d,

$J = 3.7 \text{ Hz}$), 5.27 (1H, d, $J = 3.0 \text{ Hz}$), 5.36
(1H, d, $J = 3.9 \text{ Hz}$)

高效液相色谱〔TSK 凝胶 Amide-80 柱(4.6mmID×250mm),
Tosoh 公司生产, RI 检测仪, 洗脱剂: 乙腈/水=3:2 (V/V), 流
速: 1.0ml/分〕: $t_R=5.9$ 分。

$C_{18}H_{32}O_{15}$ 的元素分析:

	C	H
理论值(%)	44.26	6.60
计算值(%)	44.28	6.58

信息实施例 3: 环糊精酶的制备

将 100ml 包含 1%(W/V) β -环糊精, 1%(W/V) 脲, 0.5%
(W/V)NaCl 和 0.1%(W/V)酵母浸膏的液体培养基(所用的水是
自来水, pH7.0)置于 500ml Sakaguchi 烧瓶中并于 120℃进行巴
氏灭菌 20 分钟。将 1 铂环量的球形芽孢杆菌 E-244 (FERM BP
-2458)的原种斜面接种于培养基中并于 30℃振荡培养 1 天。将
50ml 培养基接种于 3,000ml 容器中, 容器内含有 2,000ml 具有相
同组成并经与如上所述相同的巴氏灭菌制得的培养基, 在 30℃,
1vvm 和 350rpm 的条件下通气搅动发酵 2 天。发酵完成后, 经在
8,000rpm 下离心 20 分钟从培养物中分离出细菌细胞, 将其悬浮
于 500ml 含有 2%(W/V) Triton X-100 的 10mM 磷酸盐缓冲液
(pH7.0)中, 将悬浮液在 25℃下搅拌 1 天。经在 12,000rpm 下离

心 20 分钟从悬浮液中除去残余的细菌细胞后，上清液对 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 透析，透析的产物在 12,000rpm 下离心 20 分钟以除去不溶物。上清液作为粗酶溶液 (1) 使用。

将大约 500ml 粗酶溶液 (1) (总活性为 200 单位；蛋白量为 2083mg；比活性为 0.1；pH7.0) 置于用 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 平衡的 DEAE 琼脂糖填充柱 (直径 34×170mm) 上并使酶吸附于柱上，然后用 0—0.5M NaCl 的梯度进行洗脱。将所得到的活性级分合并，得到 105ml 粗酶溶液 (2) (总活性为 145 单位；比活性为 0.58；产率为 72.5%)。

然后，将 20ml 粗酶溶液 (2) (总活性为 31 单位；蛋白量为 29mg) 置于用含有 1M 硫酸钠的 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 平衡的 5PW 填充柱 (直径 21.5×150mm) 上并使酶吸附，用 1M—0M 硫酸钠的梯度进行洗脱。将所得到的活性级分合并，得到 50ml 粗酶溶液 (3) (总活性为 72 单位；比活性为 2.93；产率为 36%) (见日本专利公开 No. 3—15384)。

实施例 1

(1) 用于测定 α -淀粉酶活性的底物 N3G5—CNP 的 K_m 值的测定

(a) N3G5—CNP 溶液的制备

在含有 40mM NaCl 和 2mM MgCl₂ 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中溶解得自信息实施例 1 的 N3G5—CNP，制备浓度为 0.

16, 0.32, 0.48, 0.64, 0.80 和 0.96mM 的用于测定 α -淀粉酶活性的底物溶液。

(b) 偶合酶溶液的制备

将市售的衍生于根霉种的葡糖淀粉酶和衍生于杏仁的 β -葡糖苷酶混合并溶解于含有 40mM NaCl 和 2mM MgCl₂ 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中使葡糖淀粉酶和 β -葡糖苷酶的浓度分别达 163 单位/ml 和 16.3 单位/ml。在此, 所用的这些市售葡糖淀粉酶和 β -葡糖苷酶都是 Toyobo 有限公司生产的。

(c) α -淀粉酶溶液的制备

将市售的人 P 型 α -淀粉酶和人 S 型 α -淀粉酶各自溶解于水中以确保每种淀粉酶的浓度为大约 150IU/升。

所用的市售的人 α -淀粉酶是日本国际试剂公司生产的 CARIBZYME AMY。

2-氯-4-硝基苯酚的分子消光系数(ϵ)定义为 16,100, 对于 α -淀粉酶活性来说, 在 37°C 下每分钟分解 1 μ mol N3G5-CNP 的酶量被定义为 1 个国际单位(IU) (依此类推)。

(d) K_m 的测定

就人 P 型 α -淀粉酶溶液和人 S 型 α -淀粉酶溶液而言, 将 1.0ml 偶合酶溶液加入到 250 μ l α -淀粉酶溶液中并一起搅拌, 温热至 37°C 保持 1 分钟, 加入 2.0ml 每种浓度的 N3G5-CNP 溶液并搅拌, 温热至 37°C 保持 2.5 分钟, 在 400nm 处测定可变吸收度

2 分钟。同时，用 250 μ l 蒸馏水代替 α -淀粉酶溶液进行空白试验。用 *Lineweaver-Burk* 法对所得到的测定结果作图以通过最小二乘方法计算 K_m 值。结果，N3G5-CNP 对人 P 型和 S 型 α -淀粉酶的 K_m 值分别为 0.17mM 和 0.27mM。

(2) 用于测定 α -淀粉酶活性的底物 N3G5-CNP 的反应速率常数 K_p 和 K_s 的测定，和证实线性的试验

(a) α -淀粉酶溶液的制备

将上述的市售人 P 型和 S 型 α -淀粉酶溶解于蒸馏水中以制备浓度分别为 541IU/升和 510IU/升的 α -淀粉酶溶液。用这些溶液作为贮备溶液，用蒸馏水进行稀释制得浓度为 100%，80%，50%，30%，20% 和 10% (V/V) 的 6 种 α -淀粉酶溶液。

(b) 偶合酶溶液的制备

按与上述(1)的(b)相同的方法制备偶合酶溶液。

(c) N3G5-CNP 溶液的制备

将上述的 N3G5-CNP 溶解于含有 40mM NaCl 和 2mM $MgCl_2$ 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中使得缓冲液中 N3G5-CNP 的浓度为 3.25mM [终浓度(在测定体系中的浓度) 2.0mM]。此浓度相当于对人 P 型和 S 型 α -淀粉酶的 K_m 值的 11.8 和 7.4 倍，因此是足以获得最大反应速率的浓度。

(d) 线性的证实和 K_p 、 K_s 值的测定

对于各自含有人 P 型 α -淀粉酶和人 S 型 α -淀粉酶的 6 种溶

液，分别将 1.0ml 偶合酶溶液加入到 250 μ l α -淀粉酶溶液中并一起搅拌，将其温热至 37 $^{\circ}$ C 保持 1 分钟。加入 2.0ml N3G5—CNP 溶液并搅拌，将混合物温热至 37 $^{\circ}$ C 保持 2.5 分钟，在 400nm 处测定可变吸收度 2 分钟。用 250 μ l 蒸馏水代替 α -淀粉酶溶液进行空白试验。结果，证实了线性对于人 P 型 α -淀粉酶来说达到 541IU/升的浓度 ($r=0.999$)，对于人 S 型 α -淀粉酶来说达到 510IU/升的浓度 ($r=0.998$)。

下列公式也衍生于用最小二乘方法所得到的线的倾角：

$$K_p = 1.1 \times 10^{-3}$$

$$K_s = 1.1 \times 10^{-3}$$

(3) 测定 DOG3 对人 P 型 α -淀粉酶和人 S 型 α -淀粉酶的抑制常数的试验

(a) 底物(N3G5—CNP)和抑制剂 DOG3 的混合溶液的制备

将 N3G5—CNP 和得自信息实施例 2 的 DOG3 溶解于含有 40mM NaCl 和 2mM MgCl₂ 的 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中使得 N3G5—CNP 的浓度为 3.25mM (终浓度为 2.0mM) 而 DOG3 具有 7 种浓度，即 0.05, 0.11, 0.54, 1.09, 2.16, 3.25, 5.41mM (终浓度分别为 0.03, 0.07, 0.33, 0.67, 1.33, 2.00 和 3.33mM)。

(b) α -淀粉酶溶液的制备

将市售的人 P 型 α -淀粉酶和人 S 型 α -淀粉酶溶解于蒸馏

水中使得它们的浓度为大约 150IU/升。

(c) 偶合酶溶液的制备

按照如第(1)节(b)中所述的相同方法制备偶合酶溶液。

(d) 抑制常数的测定

将 250 μ l α -淀粉酶溶液与 1.0ml 偶合酶溶液混合并温热至 37 $^{\circ}$ C 1 分钟后, 加入 2.0ml 底物(N3G5-CNP)和抑制剂 DOG3 的每种混合物(具有 7 种浓度), 搅拌并温热至 37 $^{\circ}$ C 保持 2.5 分钟, 测定每个样品在 400nm 处的可变吸收度 2 分钟。

含有 0mM DOG3(不含 DOG3)的人 P 型 α -淀粉酶和人 S 型 α -淀粉酶的活性被视为 100%, 在不同浓度的 DOG3 存在下人 P 型 α -淀粉酶和人 S 型 α -淀粉酶的相对活性得自于如上所述的每一测定值。结果示于图 1。在图中, \bigcirc 是指 P 型 α -淀粉酶, \bullet 是指 S 型 α -淀粉酶。

然后, 根据前述所测定数值, 得到在 DOG3 的浓度为 0.33mM 时人 P 型和 S 型 α -淀粉酶差别最大(0.548)的相对活性(分别为 13.1%, 67.9%)和抑制常数(a, b)。

$$a = 1 - 0.131 = 0.869$$

$$b = 1 - 0.679 = 0.321$$

如此得到 K_p , K_s , a 和 b 的值, 通过用测得的可变吸收度替代公式(3)和(4)中的 T 和 W 可得到人 P 型和 S 型 α -淀粉酶的活性(P, S)。

(4) 差示测定试验

将具有已知活性的人 *P* 型和 *S* 型 α -淀粉酶按不同的比例混合，用 *N3G5-CNP* 作为底物，用 *DOG3* 作为抑制剂观察根据混合比得到的理论值和得自于公式(3)和(4)的计算值的配合性。

(a) 底物(*N3G5-CNP*)溶液的制备

将底物(*N3G5-CNP*)溶解于含有 40mM *NaCl* 和 2mM *MgCl₂* 的 50mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)中使得底物的浓度为 3.25mM(终浓度为 2.0mM)。

(b) 底物(*N3G5-CNP*)和抑制剂(*DOG3*)的混合溶液的制备

将 *N3G5-CNP* 和 *DOG3* 溶解于含有 40mM *NaCl* 和 2mM *MgCl₂* 的 50mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)中使得底物和抑制剂的浓度分别为 3.25mM(终浓度为 2.0mM)和 0.54mM(终浓度为 0.33mM)。

(c) 偶合酶溶液的制备

按照如第(1)节(b)中所述相似的方法制备偶合酶溶液。

(d) α -淀粉酶同工酶试验溶液的制备

将市售的人 *P* 型和 *S* 型 α -淀粉酶溶解于蒸馏水中，制备理论值相当于(*P*;*S*)=(10;0)和(0;10)的 α -淀粉酶溶液。其活性在保持上述第(2)节中所测试的线性的范围内。

用这些溶液作为贮备溶液，将 *P* 型和 *S* 型 α -淀粉酶的混合溶液按下列混合比(*V/V*)混合，制备 11 种 α -淀粉酶同工酶试验

溶液： $(P:S)=(10:0)$ ， $(P:S)=(9:1)$ ， $(P:S)=(8:2)$ ， $(P:S)=(7:3)$ ， $(P:S)=(6:4)$ ， $(P:S)=(5:5)$ ， $(P:S)=(4:6)$ ， $(P:S)=(3:7)$ ， $(P:S)=(2:8)$ ， $(P:S)=(1:9)$ 和 $(P:S)=(0:10)$ 。

(e) 差示测定试验

将 1.0ml 偶合酶溶液与 250 μ l 每种 α -淀粉酶同工酶试验溶液混合并将混合物温热至 37 $^{\circ}$ C 保持 1 分钟后，加入 2.0ml N3G5-CNP 溶液或 N3G5-CNP 和 DOG3 的混合溶液并温热至 37 $^{\circ}$ C 保持 2.5 分钟以在 400nm 处测定吸收度 (ΔOD)。用 250 μ l 蒸馏水代替 α -淀粉酶同工酶试验溶液进行空白试验以得到 T 和 W 值。用得自混合前活性和混合比的活性值作为理论活性，用得自通过用 Kp ， Ks ， a ， b ，T 和 W 值替代公式(3)和(4)的计算的值作为计算活性(实测值)。试验结果示于表 1 中。活性单位为 IU/升。

表 1

	P 型 α - 淀粉酶		S 型 α - 淀粉酶	
	理论值	计算值	理论值	计算值
10 : 0	183	183	0	0
9 : 1	165	168	16	14
8 : 2	147	151	32	33
7 : 3	128	133	47	47
6 : 4	110	106	63	66
5 : 5	92	90	79	79
4 : 6	73	70	95	93
3 : 7	55	55	111	106
2 : 8	37	32	126	127
1 : 9	18	18	142	141
0 : 10	0	0	158	158

从表 1 看出计算(实测)值和理论值具有高度相关性。

实施例 2

α -淀粉酶活性的差示定量测定是用具有 α -淀粉酶活性的人血清进行的。

(1) 按照本发明的方法(双道法)的差示测定

(a) 底物(N3G5—CNP)的制备, (b) 底物(N3G5—CNP)和抑制剂(DOG3)混合物的制备, 和(c)偶合酶溶液的制备都是按与实施例 1(4)的(a)–(c)中相同的方法进行的。

(d) α -淀粉酶试验溶液

具有 α -淀粉酶活性的人血清(50 个样品)。

(e) 差示定量测定

除了用 250 μ l 人血清代替 α -淀粉酶同工酶试验溶液外按与实施例 1 (4)的(e)中相同的方法进行操作。用在此得到的 K_p , K_s , a 和 b 以及 T 和 W 值替代公式(3)和(4)得到 P 和 S 值(IU/升)。

(2) 使用麦芽抑制剂的方法

(a) 底物(N3G5—CNP)溶液和(b) α -淀粉酶试验溶液的制备与上述(1)中的(a)和(b)相同。

(c) 偶合酶和麦芽抑制剂混合物的制备

将 1 小瓶麦芽抑制剂[Seikagaku 公司生产, 8AIU (1AIU 是指足以抑制 50%人 S 型淀粉酶的量(2 单位/升))(蓝色淀粉法)]

溶解于 50ml 按与实施例 1(1)的(b)中相同的方法制备的偶合酶溶液中。

(d) 差示定量测定

将 1.0ml (c)中制备的混合溶液与 250 μ l 人血清混合并温热至 37 $^{\circ}$ C 保持 1 分钟。将 N3G5—CNP 溶液(2.0ml)掺混于所说的混合物中并温热至 37 $^{\circ}$ C 保持 2.5 分钟,此后测定在 400nm 处的可变吸收度(ΔOD)2 分钟。用 250 μ l 蒸馏水代替 α -淀粉酶试验溶液进行空白试验,用此方法得到 W 值。

另一方面,除了用 1.0ml 偶合酶溶液本身代替(c)中的混合溶液外按照如上所述相同的方法进行操作,用此方法得到 T 值。

在麦芽抑制剂方法中的 K_p , K_s , a 和 b 值作为测定结果为 1.1×10^{-3} , 1.1×10^{-3} , 0.262 和 0.726。用这些值以及用此方法得到的 T 和 W 值替代公式(3)和(4)得到 P 和 S 值(IU/升)。

(3) 用本差示测定法得到的 P 值和用麦芽抑制剂法得到的 P 值示于图 2 中。结果发现这两个 P 值的相关性为 $r=0.989$, $Y=0.962X-1.469$, 这两种方法彼此间完全一致。

(4) 使用其它 α -淀粉酶试验溶液的本差示测定法和麦芽抑制剂法的测定误差的比较

按照与上述(1)和(2)中的差示测定法相同的方法测定了 P 型 α -淀粉酶活性,不同之处在于用 Enzyme Reference [人 α -淀粉酶的商品名(P 型 α -淀粉酶; S 型 α -淀粉酶=1:1), Wako Pure

Industries, Ltd. 生产] 代替人血清以比较这些方法的测定误差。结果示于表 2 中。

表 2

	本方法	麦芽抑制剂法
测定数	30	30
平均值 (IU/升)	141.2	143.9
标准误差	2.0	3.0
偏离系数	1.44	2.09

从表 2 中的偏离系数可以看出 α -淀粉酶同工酶活性能够按照本方法进行差示测定, 与麦芽抑制剂法相比其测定误差小, 精确度高。

实施例 3

(1) $G5-CNP$ 的 K_m 值, 反应速率常数 K_p 和 K_s 及 $DOG3$ 的抑制常数 a 和 b 的测定

$G5-CNP$ 的 K_m 值和反应速率常数 (K_p 和 K_s) 及 $DOG3$ 的抑制常数 a 和 b 是按实施例 1 的方法测定的, 不同之处在于用市售的 $G5-CNP$ [Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd. 生产] 代替 $N3G5-CNP$ 作为测定 α -淀粉酶的底物并用 406 单位/升 α -葡糖苷酶 [Toyobo Co., Ltd. 生产] 代替葡糖淀粉酶作为偶合酶。

结果, $G5-CNP$ 的 K_m 值, K_p 和 K_s 分别为 $0.45mM$, 1.2×10^{-3} 和 1.2×10^{-3} , $DOG3$ 的浓度为 $0.50mM$ 时 a 和 b 分别为 0.617 和 0.141。

(2) 差示定量测定

(a) 底物 $G5-CNP$ 溶液的制备

除了用 $3.25mM$ 上述的 $G5-CNP$ (终浓度为 $2.0mM$) 代替 $N3G5-CNP$ 外按与实施例 1 (4) 的 (a) 中相同的方法制备底物 $G5-CNP$ 溶液。

(b) 底物 ($G5-CNP$) 和抑制剂 ($DOG3$) 混合溶液的制备

按照与实施例 1 (4) 的 (b) 中相同的方法制备底物 ($G5-CNP$) 和抑制剂 ($DOG3$) 的混合溶液, 不同之处在于用 $3.25mM$ (终浓度 $2.0mM$) 的上述 $G5-CNP$ 代替 $N3G5-CNP$ 并使用浓度为 $0.81mM$ (终浓度 $0.50mM$) 的 $DOG3$ 。

(c) 偶合酶溶液的制备

除了用 406 单位/ ml α -葡糖苷酶 [*Toyobo Co., Ltd.* 生产] 代替葡糖淀粉酶外按与实施例 1 (4) 的 (c) 中相同的方法制备偶合酶溶液。

(d) α -淀粉酶试验溶液

具有 α -淀粉酶活性的人血清 (50 个样品)。

(e) 差示定量测定试验

除了用上述 (a) — (d) 中的溶液代替实施例 1 中 (4) 的 (a) — (d) 外按与实施例 1 (4) 中相同的方法进行差示测定。

(3) 用 $N3G5-CNP$ 作为底物溶液的差示测定

除了用上述 (d) 中的 α -淀粉酶试验溶液代替实施例 1 (4) 的 (d) 中的 α -淀粉酶同工酶试验溶液外按与实施例 1 (4) 中相同的方法进行差示测定。

(4) 用通过上述程序 (2) 和 (3) 中的差示测定法得到的 P 值绘制的图示于图 3 中。结果发现 P 值的相关性为 $r=0.986$, $Y=0.974X+1.155$, 这两种方法彼此间完全一致。

此外, 图 3 中的 $G5-CNP$ 法和 $N3G5-CNP$ 法是指分别在

(2)和(3)中所述的差示测定法。

实施例 4

(1) 用双动力学法(单测定法)测定 T 和 W 的方法

(a) α -淀粉酶试验溶液

具有 α -淀粉酶活性的人血清(70 个样品)

(b) 底物($N3G5-CNP$)溶液的制备

将 $N3G5-CNP$ 溶于含有 $40mM NaCl$ 和 $2mM MgCl_2$ 的 $50mM$ 磷酸盐缓冲液($pH7.0$)中使得底物的浓度为 $3.25mM$ (终浓度 $2.0mM$)。

(c) 偶合酶溶液的制备

按照实施例 1(1)的程序(b)的方法制备偶合酶溶液,不同之处在于使用浓度分别为 181 单位/ ml 和 18.1 单位/ ml 的葡糖淀粉酶和 β -葡糖苷酶。

(d) $DOG3$ 溶液的制备

将上述的 $DOG3$ 溶解于含有 $40mM NaCl$ 和 $2mM MgCl_2$ 的 $50mM$ 磷酸盐缓冲液($pH7.0$)中使得其浓度为 $10.73mM$ (终浓度为 $0.33mM$)。

(e) 差示定量测定

搅拌 $0.9ml$ 偶合酶溶液和 $250\mu l$ 每种人血清的混合物并于 $37^\circ C$ 温热 1.0 分钟,然后混入 $2.0ml N3G5-CNP$ 溶液。得到的混合物于 $37^\circ C$ 温热 1.0 分钟,测定在 $400nm$ 处的可变吸收度

(ΔOD)2 分钟。30 秒钟后, 进一步将 0.10ml DOG3 溶液加入到测定体系溶液中。将得到的混合物于 37°C 温热 1.5 分钟, 测定在 400nm 处的可变吸收度(ΔOD)2 分钟。用 250 μ l 蒸馏水代替 α -淀粉酶试验溶液进行空白试验以测定 T' 和 W' 。

在这种情况下, $T = T' \times 3.15 / 3.25$

接着, 通过用在实施例 1 中得到的 Kp , Ks , a 和 b 值以及在该程序中得到的 T 和 W 值替代上述的公式(3)和(4)计算 P 和 S 值 (IU/升)。

(f) 用所得到的 P 值和用实施例 2(1)的方法(双道法)得到的 P 值绘制的图示于图 4 中。结果发现 P 值的相关性为 $r = 0.9995$, $Y = 0.994X - 0.415$, 这两种方法彼此间完全一致。

换句话说, 本方法是这样一种方法, 即能够在一次测定中以良好的精确度对 α -淀粉酶同工酶进行差示测定, 能够以在双道法中用量的半量测定底物和偶合酶, 因此从经济角度看它也是一种优异的方法。

图 1

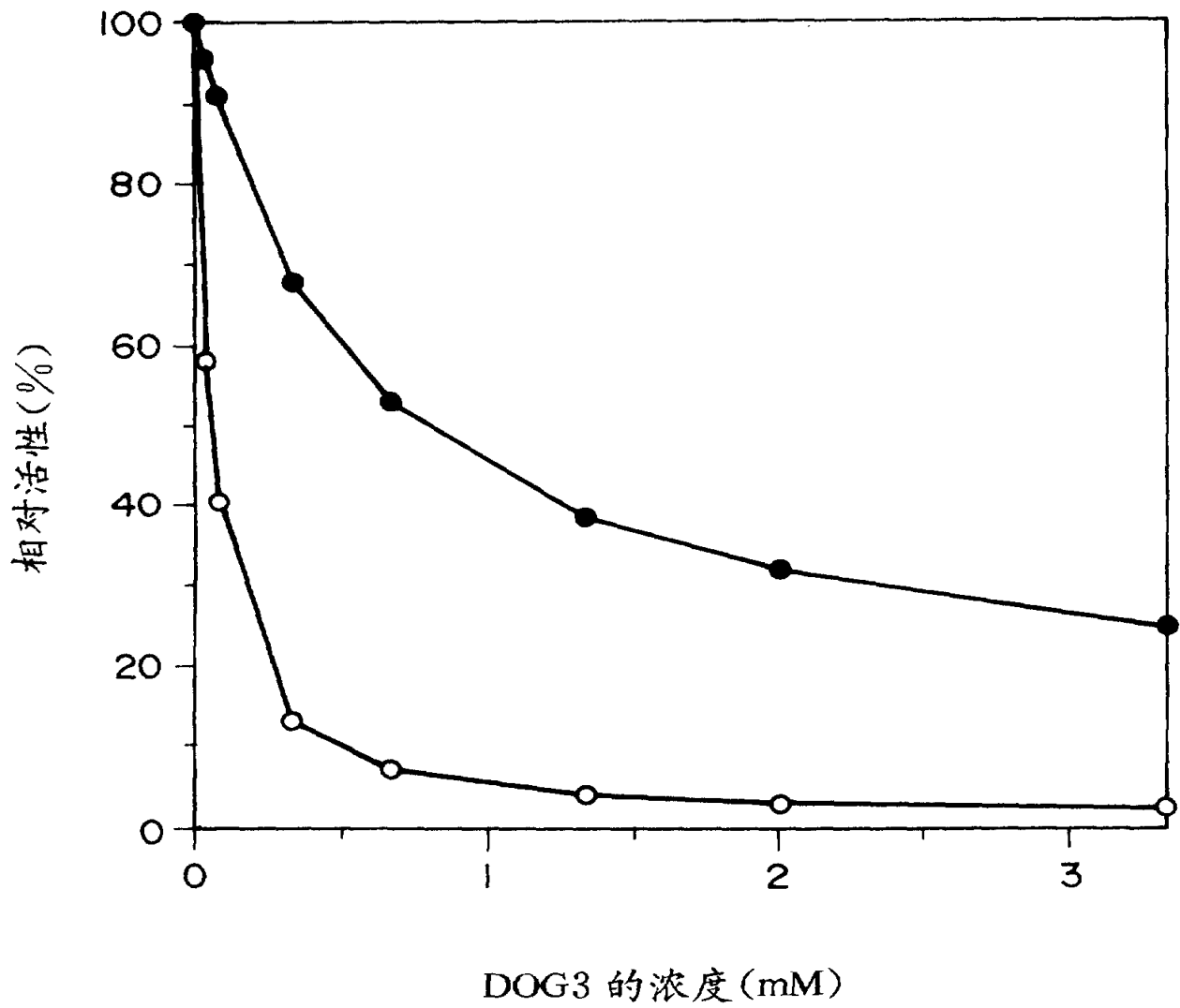


图 2

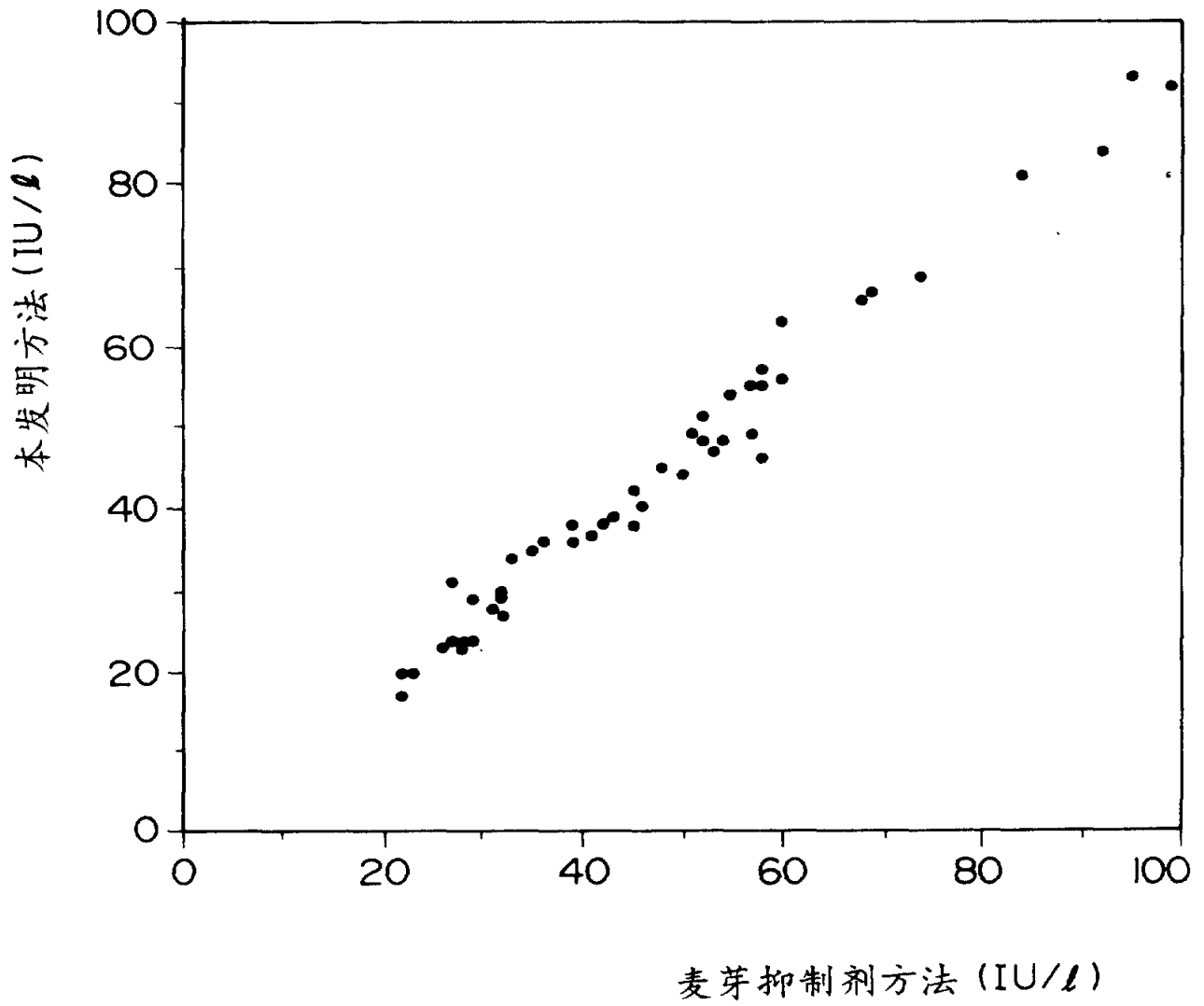


图 3

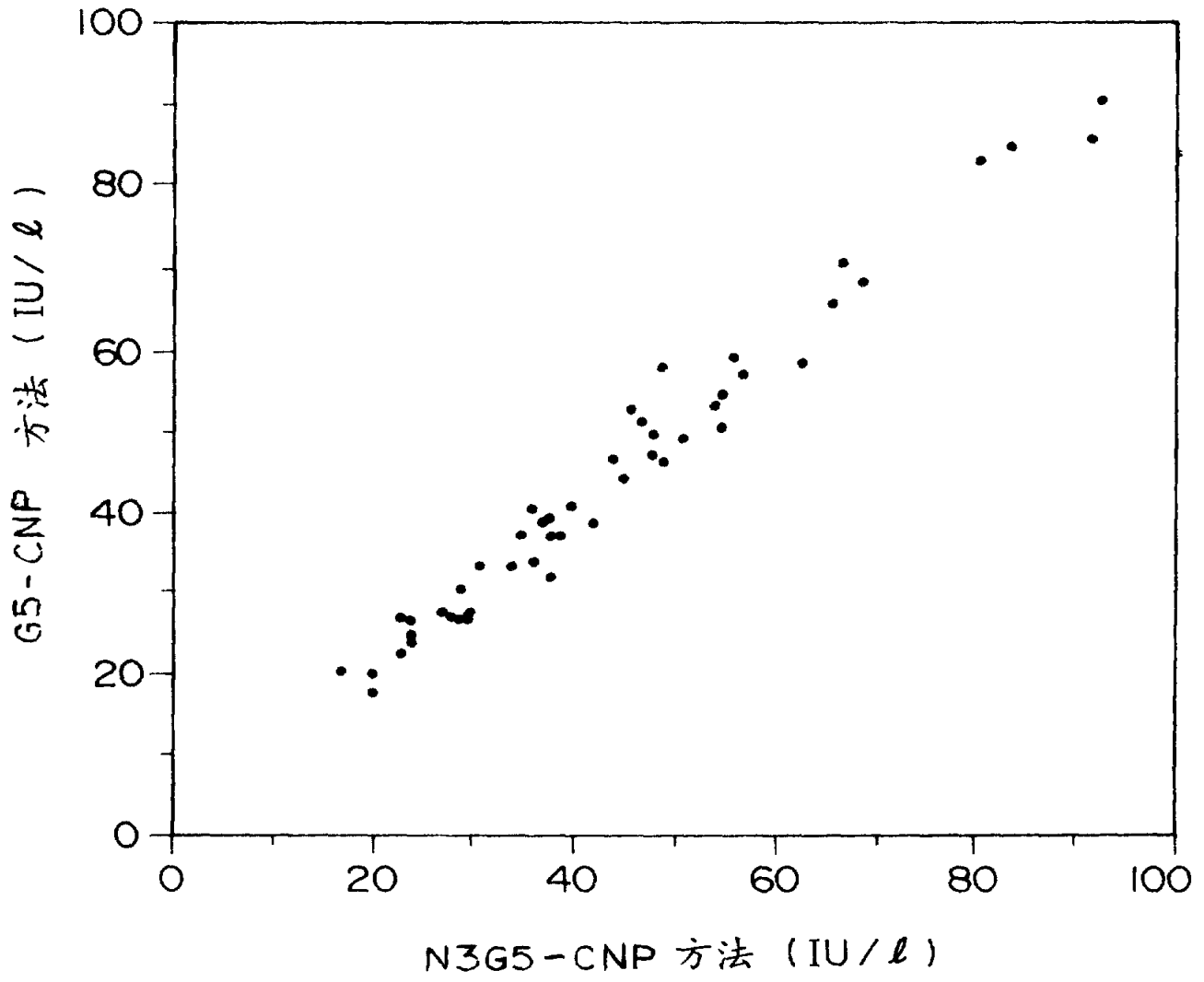


图 4

