

204371

申請日期	78.9.1
案 號	78106780
類 別	C ₁₂ Q 1/0

公告本
A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

新 型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明名稱	中 文	分析酵素中之加強信號的方法
	英 文	Signal Enhancement in Assay for an Enzyme
二、發明人	姓 名	湯姆士 H. 司庫爾特 Thomas H. Schulte
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所	美國北卡羅來那 27511 卡瑞銀木巷 103 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商·貝登狄金森公司 Becton, Dickinson and Company
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所 (事務所)	美國新澤西州法蘭克林湖萬具登道
	代 表 人 姓 名	雷蒙得 P. 奧木勒 Raymond P. Ohlmuller

經濟部中央標準局印製

五、發明說明(1)

1. 本發明之範圍。本發明有關酵素之分析以及其中所使用的物質，而且尤其有關於分析之一種方法及物質，在此分析中，可偵測的信號之增強係藉著指示劑反應之酵素催化之調節作用來達成。

2. 本發明之背景。雖然酵素科學幾乎有一百年歷史，而且酵素在許多生化反應中所扮演的重要角色於40年前就被了解，但是酵素學應用於臨床診斷却是最近的事。就在最近20年前，這些應用大約只占了在臨床實驗室中所進行之測試總數之3 - 5%，而且只有4或5種酵素經例行性分析。

相反地，現今酵素分析占了大型醫院實驗室中全部工作的25%，而且多至20 - 25種酵素可經例行性分析。這些例行性分析之詳細步驟可在有關臨床或診斷化學之任何標準參考書中找到。

在酵素分析中，體液，例如血清，尿液及腦脊髓液中之酵素濃度經決定是在正常範圍內或是超出正常範圍。在某些分析中，不正常的酵素濃度是細菌或病毒感染的結果，而且特殊酵素之分析對於特殊病原而言，在診斷上是有價值的。在其他例子中，若測知一酵素不正常地存在於體液，例如血清中，則可做為組織或器官損傷之表示。例如酒精去氫酵素其是肝臟專一性的，以及酸性磷酸酶其是前列腺專一性的，若在血漿中發現，則各別表示在這些器官中之組織損傷。鹼性磷酸酶活性之測量

(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)

在診斷肝膽系異常及骨骼異常方面有其重要性。

酵素分析係根據基質轉變成產物之酵素催化，其可經測知或計量。假如在酵素反應中，基質濃度逐漸增加，所有其它因子保持不變，則反應速率隨著基質濃度的增加而增加，直至達到最大值。任何進一步地增加基質濃度將無法激起反應速率再增加。因此，當基質以充分過量存在時，反應速率只依酵素濃度而定。

因為酵素是真正的催化劑，而且在反應當中不被改變，所以在充分的基質存在下，酵素反應的速率是恒定的；而且在分析系統中，反應速率只因酵素濃度而定。假如用來分析的酵素以低濃度存在，反應速率將是非常低的，而且可能需要一段長時間來形成足夠的產物以備測知。在那些測知的速度是基本要素的例子中，如決定血或尿液^中病原存在的例子中，這是一個嚴重的缺點。

在酵素分析中，另一個限制是在臨床樣品中，經常存在著干擾酵素活性而降低分析敏感性的物質。這些物質一般歸因於干擾，在血清及尿液樣品之酵素分析中是非常麻煩的。

在免疫分析中，分析的敏感性已經藉著各種擴增步驟來提高。在階段式擴增作用中，可測知的（一般是有顏色的）分子之數目藉著使用兩種或更多的酵素或酵素衍生物而增加。專利權屬於哈里斯（Harris）的美國專利案號4,463,090揭示了一種階段式擴增作用之免疫分

（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)

析，其中大分子催化劑，例如酵素或是和配體偶合的原酵素，活化第二酵素，此第二酵素與基質反應以生成可測知的信號，或者依次活化第三酵素。

專利權屬於謝爾夫 (Self) 的美國專利案號

4,446,231 揭示了一種循環擴增作用的酵素免疫分析，其包括第一及第二酵素系統以及第二酵素系統調節劑。第一酵素系統包括一種和一配體偶合的第一酵素。在謝爾夫之發明的第一個實例中，第一酵素系統作用在調節劑前趨物以釋放出調節劑，此調節劑是第二酵素的一個輔助因子，其活化第二酵素系統以催化使基質變成可測知的產物之反應。在此反應期間，調節劑經轉化成不活化形式，而且循環是由再活化該調節劑之第三酵素來完成。在第二個實例中，調節劑是第二系統的一個抑制劑，而且藉著第一酵素系統移去，由是第二系統經活化以作用在基質上，而且因此產生可測知的產物。

專利權屬於波古斯拉斯基 (Boguslaski) 等人的美國專利案號 4,492,751 揭示循環系統，其中酵素基質或輔酵素經接合至特殊連結的配對之某一成員。

許多分子已經顯示出引起標的酵素之特殊的不活化作用。一小組抑制劑，稱做機制基準的抑制劑，是酵素之基質，其和酵素反應以形成一共價鍵。機制基準的抑制劑已由瓦史 (Walsh) 寫了評論 (Tetrahedron 38,

871(1982))。另一小組抑制劑包括其作用有如穩定的過

(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)

渡態 (transition state) 相似物之分子。焦伯 (Gelb) 等人在生物化學 24 , 1813 (1985) 中已揭示某些氟酮 (fluoro ketones) 有如水解酵素之過渡態抑制劑。

酵素分析在分析技術的目錄中是寶貴的附加項目；然而他們容易受上述的限制所支配。本發明則專注在經改良的酵素分析，其可解決這些問題。

發明概要

本發明的一個特點是一種在液體中之酵素分析的方法，此酵素在下文中被解釋成未知酵素。經懷疑含有此未知酵素的液體和封阻調節劑及第二酵素合併在一起。未知酵素移去封阻基以提供調節劑給第二酵素。而後加入第二酵素的基質。基質經第二酵素轉化成產物，此產物提供可測知的信號。藉著第二酵素來使基質變成產物的轉化受調節劑之調節。基質至產物的反應在下文中經解釋成指示劑反應。

本發明的較佳封阻調節劑是封阻抑制劑，其經由未知酵素轉化成抑制劑，較佳的第二酵素是酯酶 (esterase)，較佳的基質是色原 (chromogen)，其可藉著酯酶轉化成不同顏色的產物。最佳的是，色原是無色的，而且經酯酶轉化成有顏色的產物，色原轉化為產物的轉化作用受到抑制劑之抑制。

本發明之另一特點包括一物質組套，其實行大體描述

五、發明說明(5)

如上之本發明之方法。

在包括酵素抑制劑未封阻的任何分析系統中，嚴重的拘束感會降臨到抑制劑及經封阻的抑制劑兩者上，假如此分析要達到最大敏感度。根據本發明，經封阻的抑制劑是未知酵素之一種良好的基質，但它在本質上是不與第二酵素反應的。同樣地，未封阻的抑制劑是第二酵素之一種有力的抑制劑，但是本質上對未知酵素沒有影響。因為經封阻的抑制劑及抑制劑和未知及第二酵素之反應，各別地是高度選擇性的，所以源於交叉反應而出現在先前的循環性酵素免疫分析(EIA)之“短路”性質大體上被消除了。

因此，本發明提供了一變通的方法，俾分析以低濃度存在於液體中的酵素。本方法提高分析敏感度至100倍，所以提供了許多優於傳統酵素分析之好處。以更低濃度存在的酵素可經決定。進行分析所需的時間大大地縮短，此允許一臨床實驗室在一給定的時間內進行更多的分析。往往信號可由肉眼計讀，去除了對昂貴及麻煩的儀器之需求。因此可以顯著地節省開銷及空間，使得根據本發明之分析能夠在小的臨床實驗室內，甚至醫生的診療室中進行。

圖式之簡單說明

附圖描述了根據本發明之方法及物質之典型分析結果。

(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)

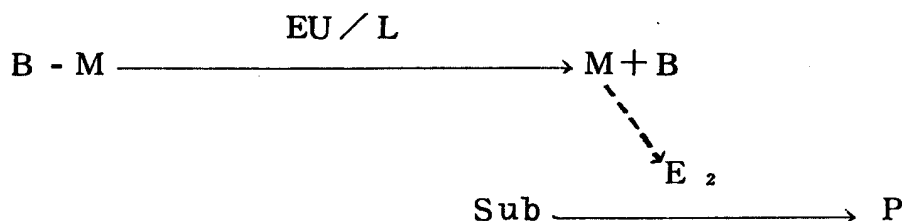
較佳實例之詳述

雖然本發明藉著許多不同形式的實例來充實內容，將詳細敘述本發明較佳實例，吾人要了解，本揭示將被認為是本發明原理之模範，而且不擬把本發明限制在經圖解及描述的實例。本發明之範圍將藉著附加的申請專利範圍及其相當語句來界限。

根據本發明之方法，經懷疑存在於液體中之未知酵素可藉著至少包括兩個擴增階段之分析方法來決定。在本揭示中，術語“經決定”表示酵素之測知，例如酵素之存在與否，或表示液體中酵素濃度的計量。

第一個擴增階段是利用未知酵素對第二酵素調節劑之去封阻作用。第二個擴增階段是利用第二酵素對指示劑反應之催化作用。這些擴增步驟繼續地發生以提供100倍或更高的信號擴增作用，因此存在於樣品中之酵素經常可以用肉眼來測知。假如需要額外的放大作用，則要提供額外的酵素以參與一階段式的連續反應，其中任一或所有的反應可提供進一步的信號擴增作用。

本發明較佳之分析方法首先將參考以下之分析流程表來加以描述，以提供對分析組成及它們的相互作用之一般性了解，而後各組成將予詳細討論。



(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)

在上述之流程表中，使用以下之定義，其中短線表示 - 化學鍵，實心箭號表示 - 化學轉化，虛線箭號表示第二酵素之調節，亦即指示劑反應之調節。

- L - 經分析之液體
- EU - 未知酵素
- E₂ - 第二酵素
- B - M - 經封阻之調節劑
- M - 第二酵素之游離調節劑
- B - 調節劑之封阻基
- Sub - 基質
- P - 產物。

從流程表可看出，被懷疑含有未知酵素之液體，與經封阻的調節劑及第二酵素合併在一起。存在於液體中之任何未知酵素移去了封阻基，而且釋放出游離調節劑。第二酵素之一基質被加入，而且在指示劑反應中，基質藉著第二酵素轉化成可測知的產物，第二酵素之催化活性藉著游離調節劑來調節。產物之水平是與游離調節劑之水平成正比或反比，亦即與未知酵素之濃度成正比或反比，各別依據調節劑是活化劑或是抑制劑而定。經計量之真正信號可以是與指示劑反應相關連之顏色，例如，產物顏色或是其形成之速率，或者是基質顏色或其消失之速率。

現在轉到分析組成之詳細敘述，未知酵素可得自任何

(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)

來源。例如，它可能存在於體液中，或者它可能分離自體液，而且隨後轉至不同的液體，例如緩衝液中。在其它例子中，未知酵素可能得自體液以外之來源，例如，一微生物培養物，或是其中之一細胞萃取物。另一方面，未知酵素可能不是來自一活體，例如，它可能是一合成的酵素。

任何能夠從第二酵素之經封阻的調節劑移走一封阻基之酵素，可以藉著本發明之方法來決定。(我們在此需要通行的說法以範圍最廣的可能術語來描述可被分析的酵素種類，假如可能的話，包括各種類之一或二個例子。)

較佳的未知酵素一般而言是水解酵素，例如磷酸酶，胜肽酶，酯酶，糖苷酶以及其它。可經由本發明之方法決定之適當未知酵素之特殊例子是胰蛋白酶，凝血酶，哺乳類肝臟酯酶，乙醯膽鹼酯酶， β -半乳糖苷酶， β -葡萄糖苷酸酶，鹼性磷酸酶，酸性磷酸酶以及白胺酸胺基胜肽酶。

經封阻的調節劑可以是任何能夠藉著未知酵素轉化成第二酵素調節劑之物質。較佳的封阻調節劑有兩個成分，即調節劑以及封阻基。最佳的封阻調節劑是一經封阻的抑制劑，其對第二酵素是不反應的，直到其封阻基經由未知酵素移去而且抑制劑經釋放至分析媒體中。因此，經封阻的抑制劑之組成之選擇乃根據未知酵素及使用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(9)

的第二酵素。封阻基必須是能夠以一化學鍵共價連接於抑制劑者，此鍵可以藉著未知酵素充分選擇性地切除，而且抑制劑組成必須抑制第二酵素之活性，但是本質上對未知酵素不具影響。封阻基從經封阻的抑制劑切除後，本質上必須對所有其它的分析成分不加干擾。因此，第二酵素及其基質之性質將於進一步描述經封阻的抑制劑及抑制劑之前加以討論。

在本發明之分析中，第二酵素一般而言是一水解酵素，其把基質轉化成產物。合適的水解酵素是，例如，磷酸酶，胜肽酶如胰臟酶，凝乳胰臟酶及胃蛋白酶，或者較佳的是酯酶如乙酰膽鹼酯酶 (AChE) 及丁基膽鹼酯酶。最佳的第二酵素是一羧基酯酶，例如兔肝臟酯酶 (RLE)。

基質可以是任何含有一基團的物質，此基團在指示劑反應中經由第二酵素切除以提供一產物，此產物藉著一與顏色相關連的信號而成為可測知的。因此，在本發明之一實例中，經測知的信號是一顏色之出現或消失，或者是從一種顏色改變成另一種顏色。在本發明之另一實例中，信號可以是基質轉化成產物之速率變化，例如，一基質之顏色經觀察可在一特定長度的時間保持不變。因此，信號之計量可在動力穩態或熱力學狀況下進行，動力計量決定變化的速率，此變化在一段期間發生，而且一般而言是合併分析試劑後，在不同時間藉著進行一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(10)

系列的計量來完成決定速率變化。動力學計量決定變化的程度，當指示劑反應的基質及產物之間達成平衡時，變化的程度就決定了。計量可以利用儀器或是，較佳者，利用肉眼來進行。

在利用第二酵素切斷基質以生成一有色產物之前，基質較好是無色。合適的基質是吡啶氧基酯以及，較佳的是，硝基酚酯類，例如鄰位及對位硝基酚醋酸鹽或丁酸鹽。這些基質是無色的，直至利用羧基酯酶切去乙醯基或丁醯基以生成有色的硝基酚。因此，當調節劑是一抑制劑以及基質是一硝基酚酯時，被計量之信號是顏色生成之抑制。

明顯的是，螢光測定法可利用在本發明之方法中。在本發明之此實例中，第二酵素可以把一非螢光生成性基質轉化成一螢光生成性產物，其中被計量之信號是螢光之調節。對本發明之此實例而言，比較好的是，調節劑是抑制劑以及第二酵素是酯酶。

如同以上所述，未知酵素從經封阻的抑制劑切去封阻基以提供第二酵素之抑制劑。合適的酵素抑制劑及經封阻的酵素抑制劑以圖示如下之化學式 I - IV 來表示，其中基團 B 的性質（描述於後）決定此化合物是抑制劑或是經封阻的抑制劑：

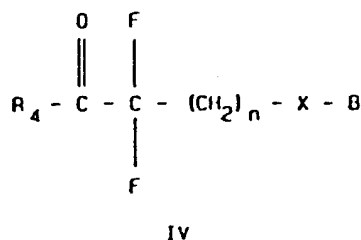
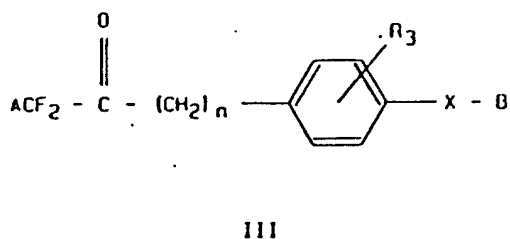
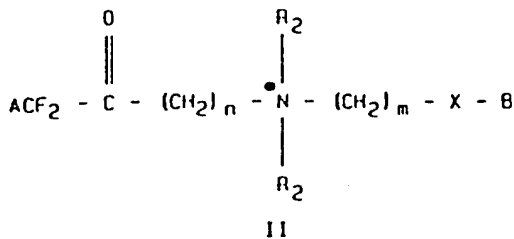
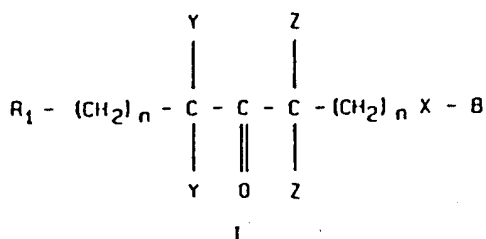
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

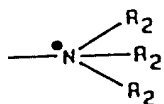
訂

錄

五、發明說明(11)



在化學式 I - IV 中，R₁ 可以是氫原子，1 - 6 碳原子的低級烷基，分支的或未分支的，或者



其中 R₂ 可以是 1 至 6 碳原子的低級烷基；R₃ 可以是氫原子，硝基，烷氧基，鹵素及其它；R₄ 可以是 1 至 10 碳原子之烷基，或是 2 至 10 碳原子之烯基或炔基，其利用一芳香基隨意取代，或者是用一硝基，經基，醯基，烷氧基，鹵烷基，經烷基，醯烷基取代之芳香基；Y 及 Z 各別在可以是 H 或 F，其中 Y 及 Z 至少有一個是 F；X 可以是 O，S 或 NR₅，其中 R₅ 可以是 H 或 R₂；n 可以是 1 至 6；m 可以是 2 至 6；A 可以是 F 或 CF₃；以及 B 可以是 H，磷酸或其鹽類，糖基，胺基酸殘基，例

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

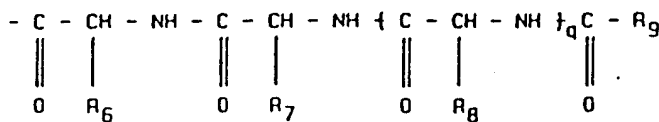
訂

線

臺灣專利局承印

五、發明說明(12)

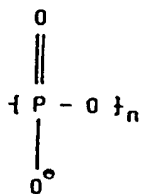
如離胺酸或魚精胺酸殘基，其經由胺基酸羧基共價結合至 X，2 至 4 碳原子之醯基，例如乙醯基或丁醯基，或者是胜肽，其化學式：



其中 R₆ 是 (CH₂)₄NH₂、(CH₂)₃NH - C $\begin{array}{l} \text{NH} \\ // \\ \text{NH}_2 \end{array}$ 或是苯基

R₇ 可以是 H 或 1 至 6 碳原子之低級烷基，分支或未分支；R₈ 可以是 H，1 至 4 碳原子之低級烷基或低級經烷基，分支或未分支，或是 CH₂COOH 或 (CH₂)₂COOH；R₉ 可以是 1 至 ⁴ 碳原子之低級烷基或 ~~低級烷基~~ 或低級烷氧基，分支或未分支，苯基或苯氧基；q 可以是 0 至 10。

當 B 是 H 時，化學式 I 至 IV 代表酵素抑制劑。當 B 是 H 以外之任何基團時，化學式 I 至 IV 代表經封阻的酵素抑制劑。當 B 是磷酸或其鹽類時，意味著 B 具有化學式：



經濟部中央標準局印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(13)

其中 P 被鍵結至 X，而且 n 可以是如上所述者。

依據化學式 I 至 IV 之抑制劑及經封阻的抑制劑，可以藉著熟練傳統化學反應的人所能想像出之任何方式來合成。合適的以及方便的方法描述於以下例子中。下列有效的酵素抑制劑之目錄只當做模式。

名稱	核磁共振數據	Ki 值(M) ⁻¹ (酯酶)
1. 1, 1, 1 - 三氟 - 3 - (4 - 羥苯基) 丙酮	(CDC13) - 3.91(s, 2H), 5.21(bs, 1H), 6.90(d, 2H), 7.10(d, 2H)	2.0 × 10 ⁻⁶ , RLE
2. 1, 1, 1 - 三氟 - 3 - (3 - 羥苯基) - 2 - 丙酮	(CDC13) - 4.00(m, 2H), 4.80(bs, 1H), 6.80(m, 3H), 7.30(m, 1H)	> 10 ⁻⁴ , PLE
3. 1, 1, 1 - 三氟 - 4 - (4 - 羥苯基) - 2 - 丁酮	(CDC13) - 2.95(m, 4H), 4.90(bs, 1H), 6.92(dd, 4H) J=4.60Hz	2.0 × 10 ⁻⁸ , RLE
4. 1, 1, 1 - 三氟 - 4 - (3 - 羥苯基) - 2 - 丁酮	(CDC13) - 2.94(t, 2H), 3.05(t, 2H), 5.70(bs, 1H), 6.80(m, 3H), 7.15(m, 1H)	1.0 × 10 ⁻⁷ , RLE
5. 1, 1, 1 - 三氟 - 5 - (4 - 羥苯基) - 2 - 戊酮	(CDC13) - 1.91(t, 2H), 2.59(t, 2H), 2.68(t, 2H), 5.23(bs, 1H), 6.95(d, 2H), 7.10(d, 2H)	1.0 × 10 ⁻⁸ , RLE
6. 1, 1, 1 - 三氟 - 5 - (3 - 羥苯基) - 2 - 戊酮	(CDC13) - 1.95(p, 2H), 2.70(t, 2H), 2.95(t, 2H), 5.40(bs, 1H), 6.70(m, 3H), 7.30(m, 1H)	1.7 × 10 ⁻⁷ , RLE
7. 1, 1, 1 - 三氟 - 6 - (4 - 羥苯基) - 2 - 己酮	(CDC13) - 1.63(m, 4H), 2.59(q, 2H), 2.70(q, 2H), 5.55(bs, 1H), 6.77(d, 2H), 7.02(d, 2H)	2.0 × 10 ⁻⁸ , RLE
8. 1 - 苯基 - 3, 3 - 二氟 - 10 - 羥基 - 4 - 癸酮	(CDC13) - 1.35(m, 4H), 1.65(m, 4H), 2.25(m, 2H), 2.70(q, 2H), 2.75(t, 2H), 3.15(bs, 1H), 3.55(t, 2H), 7.25(m, 5H)	-
9. 1, 1, 1 - 三氟 - 5 - 羥基 - 2 - 戊酮	(CDC13) - 2.15(m, 4H), 4.03(bs, 1H), 4.20(m, 2H)	3.0 × 10 ⁻⁴ , PLE
10. 1, 1, 1 - 三氟 - 6 - 羥基 - 2 - 己酮	(CDC13) - 1.85(m, 4H), 2.10(bs, 1H), 2.30(m, 4H)	4.0 × 10 ⁻⁷ , PLE
11. 1, 1, 1 - 三氟 - 8 - 羥基 - 2 - 辛酮	(CDC13) - 1.30 - 1.80(m, 8H), 2.40(bs, 1H), 2.75(t, 2H), 3.65(m, 2H)	-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(14)

- | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 12. 1 - 羥基 - 5, 5 - 二氧 -
8, 8 - 二甲基 - 4 - 壬酮 | (CDCl ₃) - 0.95(m, 9H), 1.45(t, 2H),
2.00(m, 6H), 3.12(bs, 1H), 4.15(m, 2H) | 1.2 × 10 ⁻⁶ , PLE |
| 13. 1, 1, 1, 2, 2 - 五氟 - 5 -
(4 - 羥苯基) - 3 - 戊
酮 | (CDCl ₃) - 2.94(m, 2H), 3.04(m, 2H),
4.75(bs, 1H), 6.90(d, 2H), 7.10(m, 2H) | 8.0 × 10 ⁻⁷ , RLE |
| 14. 1, 1, 1 - 三氟 - 4 - (3
- 羥苯基) - 3 - 反式 -
丁 - 2 - 酮 | (CDCl ₃) - 5.90(bs, 1H), 6.90(d, 1H)
j=16Hz, 7.25(m, 4H), 7.95(d, 1H) j=16Hz | 1.6 × 10 ⁻⁷ , RLE |
| 15. N - N - 二甲基 - N - [
2 - (羥基) 乙基] - 5,
5, 5 - 三氟 - 4 - 氧代戊
胺, 氫氧化物鹽 | (D ₂ O) - 1.90(m, 4H), 3.13(s, 6H),
3.30(m, 2H), 3.48(m, 2H), 4.01(bs, 2H). | 5.0 × 10 ⁻⁹ , AChE |
| 16. N - N - 二甲基 - N - [
4 - (羥基) 丁基] - 5,
5, 5 - 三氟 - 4 - 氧代戊
胺, 氫氧化物鹽 | (D ₂ O) - 1.95(m, 4H), 2.54(m, 4H)
3.10(s, 6H), 3.35(m, 2H), 3.55(m, 2H),
5.25(bs, 1H) | 6.5 × 10 ⁻⁸ , AChE |

註：PLE. 豬肝臟酯酶 (E. C. 3. 1. 1. 1)

RLE. 兔肝臟酯酶 (E. C. 3. 1. 1. 1)

AChE. 乙醯膽鹼酯酶 (E. C. 3. 1. 1. 7)

在本發明之一特殊應用中，未知酵素是鹼性磷酸酯酶，第二酵素是兔肝臟酯酶或乙醯膽鹼酯酶，經封阻的抑制劑是化學式 V 之氟化酮。假如鹼性磷酸酯酶存在於未知液體中，其引起磷酸酯鍵之切開以生成化學式 VI 之抑制劑。藉著添加鄰位硝苯基丁酸鹽或鄰位硝苯基醋酸鹽，VII，分析就完成了。

經濟部中央標準局印製

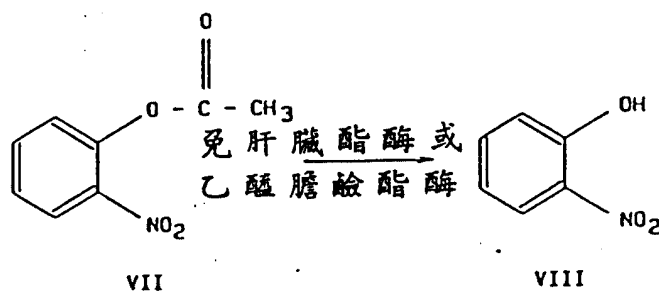
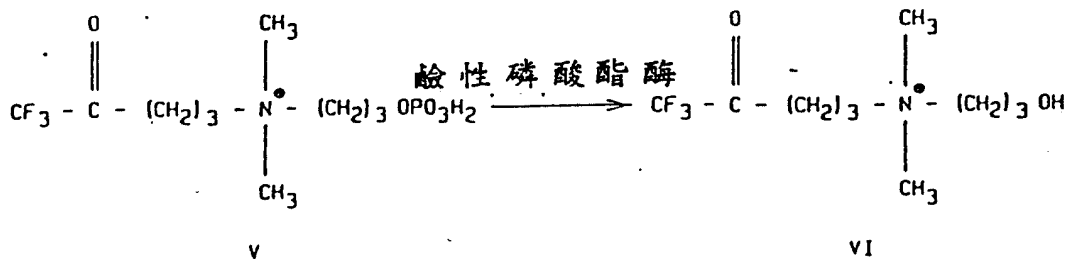
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(15)



假如抑制劑 VI 是由於鹼性磷酸酯酶存在於未知液體中而形成，則酯酶的活性被抑制，而且無色的基質 VIII 不會轉化成有色的產物 VIII。假如沒有鹼性磷酸酯酶存在於未知液體中，則無抑制劑 VI 形成，有色的產物 VIII 也因此形成了，因為酯酶未被抑制。

到目前為止，酵素擴增作用之兩個階段已經被描述。假如需要附加的信號擴增作用，則要進行一多階段之階段式擴增分析，其中在分析媒體中的大多數試劑繼續地反應，最後導致信號增強。在描述本發明這個實例時，把上述的未知酵素看做第一酵素是很方便的，第一酵素把分析媒體中之試劑以酶促轉化成第二酵素，後者把上述的第二酵素之調節劑去封阻。再者，第二酵素，或任何其後的酵素，可以和附加的試劑反應以提供另外的酵

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(16)

素，此酵素則繼續進行階段式酵素反應，直至調節劑被去封阻。另外，第二酵素不直接催化指示劑反應，而是把分析媒體中之試劑轉化成第三酵素，此酵素是指示劑反應之催化劑。

藉著適當的試劑選擇而把試劑加至分析媒體中，則可以達成任何欲求之擴增階段數目。

擴增作用發生於任何先前描述過的發明實例中，因為未知酵素，第二酵素或任何其他酵素，如真正的催化劑在作用，其中單獨酵素分子可以各別地作用在本質上是無數個的封阻調節劑或基質分子而不被消耗。因此，理論上，藉著本發明之方法，分子的第二酵素足以偵測未知酵素。實際上，第二酵素，基質及經封阻的抑制劑之添加量，以及所使用之擴增階段次數之決定，乃是根據想要達到的擴增作用水平，而且這方面之決定不會超出一般技術水平。

明顯的是，有無數種適合於決定未知酵素之分析結構可被想像出來。在本質上相同的狀況下，藉著未知酵素所產生之信號大小，和分析某範圍內已定出含量之未知酵素所產生之信號大小相互比較，可決定出酵素濃度。當本發明之方法用來決定酵素濃度時，利用適當的儀器，例如分光光度計，如，貝克曼 DU7 分光光度計（加洲愛爾文，貝克曼儀器公司）來記讀信號強度是比較方便的。

五、發明說明(17)

本發明之另一觀點是一試劑組套或物質包裹，其根據本發明之方法進行未知酵素之分析。組套可以包括第二酵素，第二酵素之經封組之抑制劑，以及第二酵素之基質。組套也可包括未知酵素之標準物，例如，一或多個濃度已經決定之樣品，或者包括有益於完成分析之其它酵素及酵素基質。它可包括溶液，例如食鹽水或緩衝液。組套之成分可置於各別的容器中，例如，小離心管 (Vials)，或者兩種或多種成分經組合置於一單獨容器中。

實驗

例行性分析技術 - 瞬時矽膠色層分析 (Flash Silicagel Chromatography) 在 32 - 63 網孔 (3 - 7 ϕ) 之 ICN 矽膠上進行。分析性薄層色層分析 (TLC) 在厚度為 0.25 公厘，以銀箔為底之矽膠板 (5 × 20 公分) (購自 EM Scientific) 上進行。製備性薄層色層分析在厚度為 2.0 公厘，以玻璃為底之矽膠板 (20 × 20 公分) (購自 EM Scientific) 上進行。熔點在湯姆士胡佛 (Thomas Hoover) 毛細熔點測試儀器上進行測量，而且未經校正。核磁共振光譜以 - IBM WP-200SY 分光光度計來記錄，而且化學位移 (ppm 為單位) 以相對於三甲基矽烷者記錄之。高效性液相色層分析 (HPLC) 則在一具 UV 偵測之瓦特氏 (Waters) 5/0 雙幫浦系統中進行，使用下列兩種置於 - 布朗李 (Brownlee) A x 300

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

504371
五、發明說明(18)

7 × 250 公厘管柱中之一溶劑系統：系統 A) 首先以 30 mM 醋酸銨 (NH₄OAC) (pH 6.5) 維持 5 分鐘，接著以直線梯度至 2.0 M 之醋酸銨沖提 30 分鐘，隨後以 1.0 M 醋酸銨維持 5 分鐘。系統 B) 使用 30 mM 醋酸銨 (pH 6.5) 緩衝系統。流速是 1.0 公撮 / 分鐘。氣相色層分析是在一 H.P. 5840A 氣相色層分析儀進行，此儀器配備有 FID 以及自動注射器，使用購自 J & W Scientific 公司之 30 M DB-1 Megabore 管柱。氣相色層分析條件如下：在 100 °C 維持 3 分鐘，接著以 10 °C / 分鐘之梯度加熱至 250 °C，隨後在 250 °C 維持 3 分鐘，流速是 16.0 公撮 / 分鐘。

抑制常數在 50 mM 之三羥甲基胺基甲烷緩衝液 (Tris buffer, pH 8.0) 中測量。酵素及抑制劑在室溫下孵育 20 分鐘。酵素基質隨後加入，而且水解速率以分光光度計測量。豬肝臟酯酶及兔肝臟酯酶之基質是鄰位 - 硝苯基丁酸鹽，乙醯膽鹼酯酶之基質是乙醯基硫膽鹼和愛耳曼 (Ellman's) 試劑。

實例 1

[4 - (3 - 氧代 - 4, 4, 4 - 三氟丁基) 苯基] 磷酸二銨

A 3 - (4 - 甲氧苯基) - 2 - (1 - 氧代 - 2, 2, 2 - 三氟乙基) 丙酸乙酯

一個 1 升而具有 4 頸之圓底燒瓶，其經安裝了逆流凝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(19)

縮器，液滴漏斗，氫氣入口，以及磁性攪拌器，此燒瓶充裝分散在油中之50%氫化鈉7.17克(0.149 M)以及300公撮之無水乙醚。9公撮絕對酒精緩緩地加至攪拌中之溶液。在氫氣停止放出後，25克(0.136 M)乙基4,4,4-三氟甲基乙醯乙酸鹽和21.3克(0.136 M)4-甲氧苯氣之混合物，於一小時期間加入。然後混合物以逆流加熱過夜。反應混合物經冷卻，以水，1 N鹽酸，無水硫酸鎂萃取，溶劑在減壓下除去。33.5克粗製的反應混合物，在60×300公厘之矽膠管柱上，以1:3之乙基醋酸鹽:己烷混合物進行色層分析。相似的部分經合併在一起，而且得到9克(27%)的油狀產物。核磁共振 NMR (CDCl₃) α - 2.12 (m, 3H), 2.67 (m, 2H), 3.85 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 7.24 (q, 4H).

B 1,1,1-三氟-e-(4-羥苯基)-2-丁酮
一個100公撮的圓底燒瓶，經安裝了逆流凝縮器，磁性攪拌器以及氫氣入口，此燒瓶充裝2.05克(6.7 M)乙基3-(4-甲氧苯基)-2-(1-氧代-2,2,2-三氟乙基)丙酸鹽，溶於酒精中之31%溴化氫20公撮，以及10公撮的水。此混合物以120°C加熱過夜，在減壓下濃縮，而且在二氯甲烷及水之間加以分離。有機層以水成二硫化物，飽和的重碳酸鈉，無水硫酸鎂萃取，而且溶劑在減壓下除去。粗製的反應混合物在50×300公厘之矽膠管柱上，以1:1之乙酸鹽:己烷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

204371

五、發明說明(20)

進行色層分析。相似的部分合併在一起，而且溶劑在減壓下移去，以生成清澈之油狀產物 600 毫克 (41%)。核磁共振 nmr (CDCl_3) δ - 2.95(m, 4H), 4.90(bd, 1H), 6.93(dd, 4H) $J=4, 60\text{Hz}$ 。

C 二乙基 [4 - (3 - 氧化 - 4, 4, 4 - 三氟丁基) 苯基] 磷酸鹽

一個 10 公撮之一頭圓底燒瓶，經安裝了氫氣入口及磁性攪拌器，而且置於冰浴中，在 5 °C 充裝 400 毫克 (1.8 mM) 之 1, 1, 1 - 三氟 - 4 - (4 - 經苯基) - 2 - 丁酮，400 毫克 (2.4 mM) 之二乙基氯化磷酸鹽，0.15 公撮之無水吡啶，以及 5 公撮之二氯甲烷。混合物在室溫下攪拌過夜，過濾以除去吡啶氯化氫，以 0.2 N 氯化氫萃取，以水萃取，而且乾燥 (無水硫酸鎂)。在減壓下除去溶劑以得到一棕色油狀粗製產物 600 毫克。利用 1 : 1 之乙酸鹽 : 己烷溶劑系統之製備性薄層色層分析，可製得一清澈之油狀產物 600 毫克 (92%)，其核共振 nmr (CDCl_3) δ - 1.50(m, 6H), 3.0(m, 4H), 4.20(m, 4H), 7.15 (s, 4H)。

D [4 - (3 - 氧代 - 4, 4, 4 - 三氟 - 丁基) 苯基] 磷酸二銨

一個 25 公撮之一頭圓底燒瓶，經安裝了氫氣入口及磁性攪拌器，充裝 5.0 公撮之二氯甲烷，140 毫克 (0.4 mM) 之二乙基 [4 - (3 - 氧代 - 4, 4, 4 - 三氟丁基

五、發明說明(21)

) 苯基] 磷酸鹽以及 2.0 公撮之溴化三甲基矽烷。此混合物在室溫攪拌 3 小時後，加入 10 公撮甲醇，而且揮發性物質在減壓下除去。殘留物溶於水中，而且以 1.0 N 之氫氧化鈉調 pH 值至 7.3。水溶液以乙醚萃取，而且經冷凍乾燥以得到白色固體物 190 毫克。此物質溶於 10 公撮之 30 mM 醋酸銨緩衝液中，而且藉著高效性液相色層分析使用系統 A 來純化。凍乾後之產物重量是 50 毫克 (37%)。其熔點是 235 - 240 °C。核磁共振

nmr (D_2O) δ - 1.90(m, 2H), 2.56(m, 2H), 4.65(s, DOH),
6.88(dd, 4H)J=6, 82Hz.

實例 2

1 - 羥基 - 5, 5 - 二氟 - 8, 8 - 二甲基 - 4 - 壬酮

A 乙基 2, 2 - 二氟 - 5, 5 - 二甲基己酸鹽

一個 100 公撮之三頸圓底燒瓶，經安裝了液滴漏斗，氫氣入口，水浴，以及磁性攪拌器，充裝 8.0 公撮之二氯甲烷以及 2.21 克 (20 mM) 之乙基 2 - 氧代 - 5, 5 - 二甲基己酸鹽。溶於 5 公撮二氯甲烷之二乙基胺基硫三氟化物 2.11 克 (13 mM) 以 15 分鐘時間加至反應混合物，在室溫下攪拌此混合物過夜。此反應混合物在水和二氯甲烷之間被分離，把有機層加以乾燥 (無水硫酸鎂)，而且在減壓下移去溶劑。油狀殘留物在 83 - 88 °C 蒸餾，得到 1.0 克 (25%) 產物。其核磁共振 nmr ($CDCl_3$) δ - 0.95(s, 9H), 1.40 (m, 4H), 2.10 (m, 2H), 4.35 (q, 2H).

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

204372
五、發明說明(22)

B 2, 3, 4, 5 - 四氫 - 2 - 氧代 - 3 - [(5, 5 - 二甲基 - 2, 2 - 二氟 - 1 - 氧代) 己基] 咪喃

一個 25 公撮之三頸圓底燒瓶，經安裝了乾燥試管，液滴漏斗，加熱罩，以及磁性攪拌器，充裝 0.24 克 (5.0 mM) 分散於 50 % 油中之氫化鈉。氫化鈉以無水己烷清洗 (兩次，每次 10 公撮)，而且把 5 公撮之乙醚加至三角燒瓶中。5 滴絕對乙醇和 5 公撮乙醚之混合物緩緩地加至氫化鈉懸浮液中。氫氣停止放出後，1.0 克 (5.0 mM) 之 2, 2 - 二氟 - 5, 5 - 二甲基 - 己酸乙酯和溶於 5 公撮乙醚之 0.43 克 (5.0 mM) 丁酸內酯之混合物，以 20 分鐘時間加入。溶液經逆流 3 小時，而且在室溫攪拌過夜。反應混合物用 1 N 氯化氫分離，有機層用水清洗 (兩次，每次 50 公撮)，經乾燥 (無水硫酸鎂)，而且在減壓下移去溶劑。油狀殘留物 0.88 克，從己烷：乙酸鹽混合物結晶出產物 0.66 克 (53 %)。產物之核磁共振 nmr (CDCl₃) δ - 0.95 (s, 9H), 1.35 (m, 2H), 2.00 (m, 3H), 2.50 (m, 2H), 3.00 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 4.5 (m, 1H)

C 1 - 羥基 - 5, 5 - 二氟 - 8, 8 - 二甲基 - 4 - 壬酮

一個 10 公撮之一頸圓底燒瓶，經安裝了氫氣入口，磁性攪拌器，以及逆流凝縮器，充裝 1.0 公撮之食醋，4 滴濃鹽酸以及 200 毫克 (0.81 mM) 之 2, 3, 4, 5 - 四氫 - 2 - 氧代 - 3 - (5, 5 - 二甲基 - 2, 2 - 二氟 - 1 - 氧代己基) 咪喃。反應混合物以 110 °C 加熱過夜。反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

中華民國六十年八月廿九日

五、發明說明(23)

應混合物用乙醚萃取，而且乙醚用水交叉清洗，經乾燥（無水硫酸鎂），而且在減壓下除去溶劑。殘留物在10×60公厘之矽膠管柱上，使用9：1之己烷：乙酸鹽混合物進行色層分析，得到清澈油狀物。核磁共振

nmr (CDCl₃) δ - 0.95(s, 9H), 1.45(t, 2H), 2.00(m, 6H),
3.12(bs, 1H), 4.15(m, 1H).

實例 3

N, N - 二甲基 - N - [2 - (羥基) 乙基] - 5, 5, 5 - 三氟 - 4 - 氧代五胺，氫氧化物鹽

A 2, 3, 4, 5 - 四氫 - 2 - 氧代 - 3 - [(2, 2, 2 - 三氟 - 1, 1 - 二羥基) 乙基] 吡喃

一個 3 公升的三頸圓底燒瓶，經安裝了逆流凝縮器，液滴漏斗，氫氣入口，磁性攪拌器，以及加熱罩，充裝 36 克 (0.75 M) 溶於 50 % 油中之氫化鈉。氫化鈉用無水己烷清洗 (兩次，每次 200 公撮)，然後懸浮在 800 公撮之乙醚以及 22 公撮之純粹酒精中。丁酸鹽內酯 60.2 克 (0.7 M) 和溶於 750 公撮乙醚之乙基三氟乙酸鹽 99.4 克 (0.7 M) 之混合物，以保持反應輕微逆流之速率，加至懸浮液中。混合物再經逆流 2 小時，而後在室溫攪拌過夜。反應在冰浴中冷卻，而且加入 1 N 鹽酸 250 公撮。有機層被分離，以水清洗 (兩次，每次 200 公撮)，經乾燥 (無水硫酸鎂)，而且在減壓下移去溶劑。殘留物從己烷：乙酸鹽結晶出產物 64.0 克 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(24)

45.4 %)，其熔點是 87 ~ 90 °C。核磁共振

nmr (DMSO-d₆) δ - 2.33(m, 2H), 3.09(t, 1H) J=7Hz, 4.20(m, 2H)
7.00(s, 1H), 7.52(s, 1H).

B 1, 1, 1 - 三氟 - 5 - 羥基 - 2 - 戊酮之製備

一個 500 公撮之三頸圓底燒瓶，經安裝了逆流凝縮器，加熱罩，以及磁性攪拌器，充裝 61.5 克 (0.31 M) 之 2, 3, 4, 5 - 四氫 - 2 - 氧代 - 3 - (2, 2, 2 - 三氟 - 1, 1 - 二羥基 - 乙基) 呋喃，6.4 公撮之濃鹽酸，10 公撮之水，以及 80 公撮之乙酸。反應混合物以 125 °C 加熱過夜。然後再加入 3 公撮之濃鹽酸以及 5 公撮之水，而且反應混合物再加熱 10 小時。反應混合物在水和乙醚之間被分離，而水層用固體重碳酸鈉 (100 克) 中和。乙醚溶液用水洗滌 (兩次，每次 20 公撮)，經乾燥 (無水硫酸鎂)，而且在減壓下移去溶劑，得到 60 克 (45 %) 淡黃色油狀產物。核磁共振 nmr (CDCl₃) δ - (2.1 4m, 4H), 4.03(m, 1H), 4.20(m, 1H).

C 1, 1, 1 - 三氟 - 5 - 溴 - 2 - 戊酮

一個 500 公撮之三頸圓底燒瓶，經安裝了液滴漏斗，磁性攪拌器，冰 - 鹽浴，以及氫氣入口，充裝 125 公撮之無水二甲基甲醯胺，29 克 (35.7 mM) 之三氟 - 5 - 羥基 - 2 - 戊酮。混合物冷卻至 - 5 °C，而且 11.5 g (71.6 mM) 的溴在兩小時期間一滴滴地加入。在室溫下攪拌過夜後，反應混合物經由 - 30 公分之管柱在 2.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(25)

公厘水銀柱壓力下蒸餾。兩個部分經收集；第一部分來自 27 - 35 °C 者，第二部分來自 35 - 70 °C 者。第二部分在水和乙醚之間被分離，有機層用水洗滌（三次，每次 100 公撮），經乾燥（無水硫酸鎂），而且在室溫下減壓蒸發，得到一無色油狀混合物，其由二甲基甲醯胺，乙醚，及欲求之產物組成，未經進一步純化之產物用於下一個反應。

D N, N - 二甲基 - 5, 5, 5 - 三氟 - 4 - 氧代戊胺

一個 500 公撮之三頸圓底燒瓶，經安裝了液滴漏斗，氫氣入口，磁性攪拌器，以及冰 - 鹽浴，在 - 8 °C 充裝 21.5 克 (0.45 M) 之無水二甲胺。然後在 - 10 °C 把溶於二甲基甲醯胺之 1, 1, 1 - 三氟 - 5 - 溴 - 2 - 戊酮 19.4 克 (88.5 mM) 和乙醚一滴滴地加至混合物。懸浮液在 - 10 °C 攪拌 2.5 小時。溶劑則從沉澱物上清液移去。沉澱物以乙醚洗滌（三次，每次 200 公撮），有機層合併在一起，以水洗滌（二次，每次 30 公撮），經乾燥（無水硫酸鎂），而且減壓下蒸發，得到 15.9 克 (92 %) 之淡黃色油狀物。其鹽酸鹽核磁共振 nmr (CDCl₃) δ - 1.98(s, 4H), 2.90(s, 6H), 3.21(t, 2H)。

E N, N - 二甲基 - N · [2 - 甲氧基) 乙基] - 5, 5 - 三氟 - 4 - 氧代戊胺，氫氧化物鹽

一個 25 公撮之一頸圓底燒瓶，充裝 2.95 克 (21.2 mM) 之 2 - 溴乙基甲醚，0.33 克 (1.77 mM) 之 N,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

204372

A6
B6

五、發明說明(26)

N - 二甲基 - (5, 5, 5, - 三氟 - 4 - 氧代戊胺) 以及
 2.5 公撮之二甲基甲醯胺，混合物在室溫攪拌 3 天。在
 減壓下移去溶劑，而且琥珀色油狀物在一氫氧化物型
 Dowex - 1 管柱 (15 × 200 公厘) (含 200 公撮水) 上
 進行色層分析。來自管柱之流出物經凍乾產生琥珀色油
 狀物 0.28 克 (60 %)，此產物是氫氧化物鹽。核磁共振
 nmr (D₂O) δ - 1.94(m, 2H), 3.13(s, 6H), 3.39(s, 3H),
 3.41(m, 2H), 3.60(m, 2H), 3.88(bs, 2H).

此物質用於下一個反應而未經進一步純化。

F N , N - 二甲基 - N - [2 - 羥基) 乙基] - 5, 5,
 5 - 三氟 - 4 - 氧代戊胺，氫氧化物鹽

一個 10 公撮之圓底燒瓶，經安裝了氫氣入口以及逆流
 凝縮器，充裝 0.275 g (1.1 mM) N , N - 二甲基 -
 N - [2 - (甲氧基) 乙基] - 5, 5, 5 - 三氟 - 4 - 氧
 代戊胺，氫氧化物鹽，4.0 公撮水及 8.0 公撮溶於乙酸
 之 30 % 溴化氫。此混合物在 120 °C 加熱 5 小時，冷卻，
 而且在減壓下移去溶劑。殘留物以水共同蒸發 (3 次，
 每次 20 公撮)，而且產生之油狀物在一氫氧化物型
 Dowex-1 (15 × 200 公厘) 管柱上進行色層分析。在減
 壓下蒸發流出物，得到氫氧化物鹽產物 0.17 克 (63 %)
 。核磁共振 nmr (D₂O) δ - 1.90(m, 4H), 3.13(s, 6H),
 3.30 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 4.01(bs, 2H).

(請先閱讀背面之注意事項再填寫)

經濟部中央標準局印製

五、發明說明(27)

實例 4

N, N - 二甲基 - N - [2 - (磷酸氧基) 乙基] - 5, 5, 5 - 三氟 - 4 - 氧代戊銨，銨鹽

一個 10 公撮之三頸燒瓶，經安裝了液滴漏斗，氫氣入口，磁性攪拌器，以及冰鹽浴，充裝 0.093 公撮 (1.0 mM) 磷酸氧氯化物以及 0.5 公撮三甲基磷酸鹽。在 10 °C 把 70.0 毫克 (0.2 mM) N, N - 二甲基 - N - [2 - (羥基) 乙基] - 5, 5, 5 - 三氟 - 4 - 氧代戊銨，氫氧化物鹽一滴滴地加至這個混合物中。混合物經攪拌 30 分鐘，然後置於一冷凍器過夜。混合物先後以乙醚及石油醚研磨 (四次，每次 50 公撮)，得到樹脂狀沉澱物。此沉澱物以冰覆蓋，用 1 N 氫氧化鈉中和至 pH 6.0，而且在減壓下蒸發至乾。產生之固體物 107 毫克，溶於 pH 7.0 之 30 mM 醋酸銨緩衝液，而且藉著高效性色層分析以系統 B 來純化。在第 12 分鐘流出之產物，藉著緩衝液之凍乾而分離出 9.0 毫克 (11%) 無色樹脂。核磁共振 nmr (D₂O) δ - 1.90 (m, 4H), 3.14 (s, 6H), 3.42 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 4.19 (bs, 2H)。

概要言之，本發明提供一方法以偵測及決定存在於液體中之未知酵素。此液體與第二酵素及經封阻之調節劑接觸，因此未知酵素移去封阻基以提供第二酵素之調節劑。第二酵素之基質隨後加入。調節劑調節第二酵素轉化基質成為一產物，以生成可測知的信號。信號之偵測

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

204371

A 6
B 6

五、發明說明 ()

修正
補充 本年2月5日

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

確立了未知酵素樣品之存在與否。藉著測量信號之大小，
酵素之濃度可被決定。調節劑與第二酵素提供兩個擴增階
段，因此信號經擴增100倍或更多倍，使得肉眼觀察出信
號之時間比利用傳統的酵素分析表少了100倍。

實例 5 ~ 8

材料：

卵清蛋白

緩衝液 A：5mM 磷酸鉀及 1mM 氯化鎂，pH 7.3

緩衝液 B：50mM 二乙醇胺及 0.5mM 氯化鎂

緩衝液 C：50mM tris HCl，pH 8.0

β -半乳糖苷酶， 2.3×10^{-2} mg/ML 於緩衝液 A 中

鹼性磷酸酶，0.4 mg/ML 於緩衝液 B 中

α -C， 7.0×10^{-3} mg/ML 於緩衝液 C 中

4-(4-(β -半乳糖呋喃糖基)苯基)-1,1,1-三氟-2-丁酮，

300 μ M 於緩衝液 A 中 (封阻抑制劑 1)

4-(4-(N-乙醯苯基丙胺醯胺基)苯基)-1,1,1-三氟-2-丁酮

，100 μ M 於緩衝液 C 中 (封阻抑制劑 2)

4-(4-磷苯基)-1,1,1-三氟-2-丁酮，300 μ M 於緩衝液 A 中

(封阻抑制劑 3)

二氯胺苯基丁酸酯，200 μ m 於 50mM Tris 中。

實例 5

偵檢 β -半乳糖苷酶之活性

五、發明說明 () 修正
補充 82年2月5日

於緩衝液 A 中製備含 1×10^{-3} mg/ML 之 RLE 及 0.2 mg/ML 卵清蛋白之溶液。將 0.9 ML 整分移入塑膠管 (管 1) , 且 0.8 ML 整分移入另 10 支管 (管 2 至 11) 。緩衝液 A (100 μ L) 中 β - 半乳糖苷酶加入管 1 , 而 1 : 5 逐次稀釋液被編成管 2 至 10 。整分 (50 μ L) 該液被移至微滴度板之井。每個井內加入封阻抑制劑 1 (50 μ L) , 20 分鐘後再加入 100 μ L 受質溶液。再三分鐘後, 加入 25 μ 之 1 - 丙醇。每個井之吸收度在 620nm 波長被測定。實驗結果如附圖 1。

實例 6

偵檢鹼 α - 胰凝乳蛋白酶之活性

以如例 5 所用方法, 經由 α - 胰凝乳蛋白酶之作用於封阻抑制劑, 抑制被受質及 RLE 著色, 而 α - 胰凝乳蛋白酶之活性被測定。實驗結果如附圖 1。

實例 7

偵檢鹼性磷酸酶之活性

以如例 V 所用方法, 經由鹼性磷酸酶之作用於封阻抑制劑, 抑制被受質及 RLE 著色, 而鹼性磷酸酶之活性被測定。實驗結果如附圖 1。

實例 8

偵檢 β - 半乳糖苷酶之活性

於緩衝液 A 中製備含 1×10^{-3} mg/ML 之 RLE 及 0.2 mg/ML 卵清蛋白之溶液。該緩衝液 A 為 12 管 (每支 0.5 ml) ,

五、發明說明 ()

修 本 82 年 2 月 5 日
補充

1 ml 之尿和 1 ml 之緩衝液 A 混合。0.5 ML 這溶液逐次稀釋 (1:2) 於 12 支管。從每一支管各取 0.5 ML 整份移至微滴定度盤之 6 列井。在 720 分鐘 (列 A 及 B) , 40 分鐘 (列 D 及 E) 及 60 分鐘 (列 G 及 HY) , 50 μ L 之 300 μ M 封阻抑制劑溶液加入井 1 至 11。管柱 12 接收 50 μ 緩衝液 A。在 t=80 分鐘, 100 μ L 之受質溶液加入各井內。3 分鐘後, 加 50 μ l 1 - 丙醇。每個井之吸收度在 620 nm 波長被測定。結果如附圖 2。

(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：分析酵素中之加強信號的方法)

分析存在於一液體中之未知酵素之一種方法，其包括藉著利用第二酵素及此第二酵素之一封阻調節劑 (blocked modulator) 之信號放大。在液體中的未知酵素從封阻調節劑中移去一個封阻基。所產生的調節劑活化或抑制第二酵素，此酵素催化一種指示劑反應，在反應中，基質經轉化成產物。在液體中，未知酵素之存在與否，經由與指示劑反應相關之信號，例如顏色改變或顏色改變之速率，加以表示。樣品中酵素之濃度可藉著信號之測量來決定。本發明包括有益於實行本發明方法之材料組套。

英文發明摘要(發明之名稱：Signal Enhancement in Assay for an Enzyme)

A method for assay for an unknown enzyme suspected to be present in a liquid includes signal amplification by use of a second enzyme and a blocked modulator for the second enzyme. Unknown enzyme in the liquid removes a blocking group from the blocked modulator. The resulting modulator activates or inhibits the second enzyme which catalyzes an indicator reaction in which a substrate is converted to a product. The presence or absence of the unknown enzyme in the liquid is indicated by a signal, such as a color change or a rate of color change, associated with the indicator reaction. The concentration of the enzyme in the sample may be determined by the measurement of the signal. The invention includes a kit of materials useful for performing the method of the invention.

附註：本案已向 美 國(地區) 申請專利，申請日期：88' 8.11. 案號：07 / 230,933

204372

A7
B7
C7
D7

六、申請專利範圍

修正
補充 本 82 年 2 月 5 日

公 告 本

第 78106780 號「分析酵素中之加強信號的方法」專利案

(82年2月修正)

1. 一種測定在液體中之酵素之方法，包括：

(a) 將懷疑含有糖苷酶或磷酸酶之液體和羧基酯酶及羧基酯酶之封阻過的抑制劑結合，該糖苷酶或磷酸酶將封阻過的氫酮抑制劑水解成氫酮抑制劑；

(b) 將該羧基酯酶之受質加入該液體中，該氫酮抑制受質被羧基酯酶水解成有色產物；其中受質係選自硝基苯酯及吲哚氫基酯；及

(c) 藉著偵檢一與該有色產物相關聯之信號來測定該糖苷酶或磷酸酶。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包括測定該液體中之糖苷酶或磷酸酶之濃度，乃藉著測量該信號之大小，並且把它和一種與產物相關聯之信號大小相比較，此時將含有該糖苷酶或磷酸酶預定量之液體樣品重複進行步驟 (a) 至 (c)。

3. 一種測定在液體中之酵素之方法，包括：

(a) 將懷疑含有糖苷酶或磷酸酶之第一液體與酯酶及酯酶之封阻過的氫酮抑制劑結合，該糖苷酶或磷酸酶將封阻過的氫酮抑制劑水解成氫酮抑制劑；

(b) 將色原加至該液體中，該氫酮抑制劑抑制色原被酯水解成有色產物；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

204371

A7
B7
C7
D7

六、申請專利範圍

(c) 計量抑制作用之大小；及

(d) 測定該液體中之糖苷酶或磷酸酶之濃度，係當將含有

該糖苷酶或磷酸酶預定量之液體樣品重複進行步驟

(a) 至 (c) 時，比較該大小與抑制形成有色產物之大小而定。

4. 一種進行糖苷酶或磷酸酶分析之物質組套，包括：

- 含有預定量糖苷酶或磷酸酶之液體；

- 羧基酯酶；

- 羧基酯酶之受質；及

- 羧基酯酶之封阻過的氫酮抑制劑，

其中受質係選自硝基苯酯及吡啶氫基酯。

5. 如申請專利範圍第 4 項之組套，其尚包括一本質上不含

該糖苷酶或磷酸酶之液體樣品。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

204371

78106780

修正
本8年3月20日
補充

FIG-1

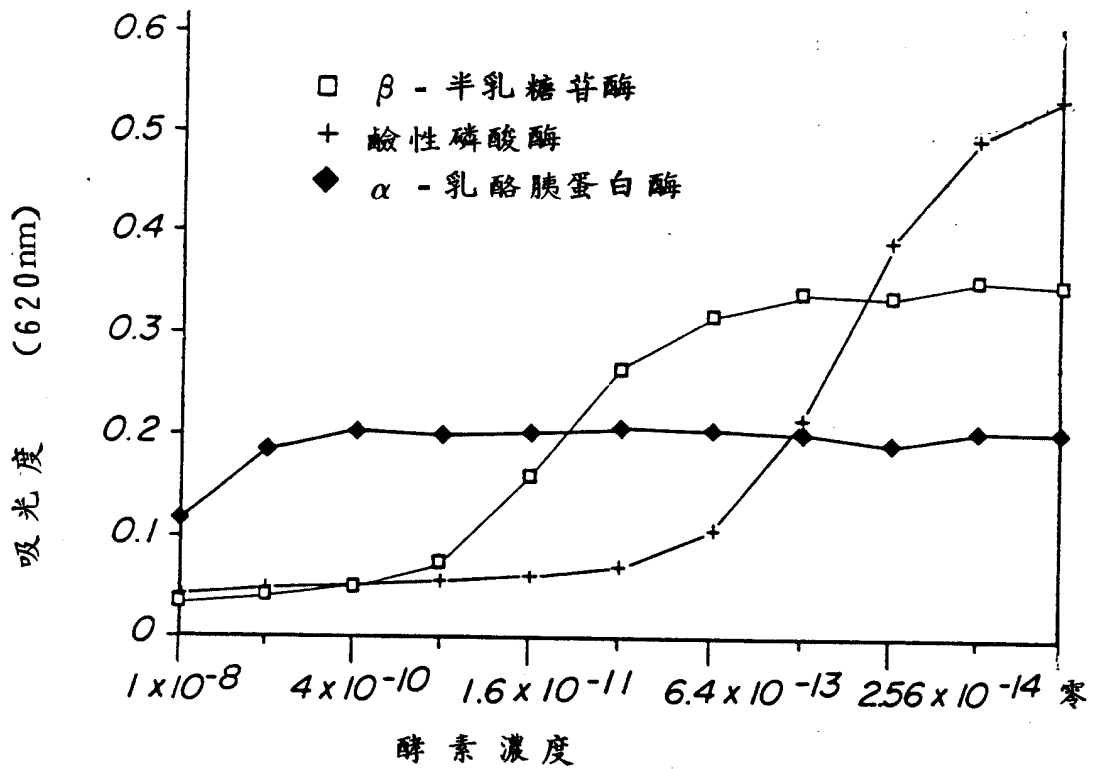


FIG-2

