[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12Q 1/48
C12Q 1/26 C12Q 1/533
C12Q 1/54

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99124799.X

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1179051C

[22] 申请日 1999.12.10 [21] 申请号 99124799.X
[30] 优先权
[32] 1998.12.11 [33] JP [31] 353586/1998
[32] 1999. 2.18 [33] JP [31] 39433/1999
[71] 专利权人 协和梅迪克斯株式会社
地址 日本东京
[72] 发明人 田添荣 三池彰
审查员 周 霞

[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 杨宏军

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称 1，5－脱水山梨醇的定量方法以及定量试剂

[57] 摘要

提供一种可以简便定量含葡萄糖试样中的特定物质例如 1，5－脱水山梨醇的方法，及其所使用的定量用试剂和定量用试剂盒。1，5－脱水山梨醇的定量方法及其所使用的定量用试剂和定量用试剂盒，对于含葡萄糖试样中 1，5－脱水山梨醇的定量方法，其特征在于在该试样中将葡萄糖转化为果糖－1，6－二磷酸，并使可以将 1，5－脱水山梨醇转化为 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸的酶系发生作用，使之生成 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸，然后在氧化型辅酶存在下使 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶发生作用，对生成的还原型辅酶进行定量。

ISSN1008-4274

1. 含葡萄糖试样中 1，5－脱水山梨醇的定量方法，其特征在于使试样与二磷酸腺苷、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷依存性己糖激酶、己糖磷酸异构酶和 6－磷酸果糖激酶接触，形成果糖－1，6－二磷酸和 1，5－AG－6－磷酸，在选自氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、硫代氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸以及硫代氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的氧化型辅酶的存在下通过 1，5－AG－6－磷酸脱氢酶的作用将形成的 1，5－AG－6－磷酸脱氢，对通过脱氢反应生成的还原型辅酶进行定量。

2.如权利要求 1 所述的定量方法，其中所说的氧化型辅酶是氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的定量方法，还原型辅酶的定量是通过对由四唑鎓盐生成的色素比色定量而进行的。

4. 1，5－脱水山梨醇定量用试剂盒，其含有第 1 试剂、氧化型辅酶和第 2 试剂，

第 1 试剂含有 ADP、ATP、ADP－依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶、6－磷酸果糖激酶;

氧化型辅酶选自氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、硫代氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸以及硫代氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸；以及

第 2 试剂含有 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶。

5. 1，5－脱水山梨醇定量用试剂盒，其含有第 1 试剂、第 2 试剂和氧化型辅酶，

第 1 试剂含有 ADP、ATP、ADP－依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶、6－磷酸果糖激酶;

第 2 试剂含有 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶；以及

氧化型辅酶选自氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、硫代氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸以及硫代氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。

6.如权利要求 4 或 5 所述的定量用试剂盒，其中所说的氧化型辅酶是氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。

7.如权利要求 4 或 5 所述的定量用试剂盒，其中第 1 试剂中还含有电子受体和镁盐，所说的第 2 试剂中还含有四唑鎓盐。

1，5－脱水山梨醇的定量方法以及定量试剂

本发明涉及利用酶反应在试剂中葡萄糖转化为其它物质后对试剂中的特定物质例如1，5－脱水山梨醇等进行定量的方法以及所使用的定量用试剂和定量用试剂盒。

在生物体试样中有时存在葡萄糖，而且比需要进行定量的物质浓度高，有时会导致需要定量的物质的定量结果不正确。这时，可以采用先对该物质进行定量，再从试样中除去试样中的葡萄糖，或转化为对需定量物质没有影响的其它物质后进行定量的方法。

从试样中除去葡萄糖的方法已知例如采用离子交换柱色谱法分离葡萄糖的方法(特开昭63－185397号公报、特公昭64－6756号公报)等。另外试样中的葡萄糖转化为其它物质的方法已知例如(1)在三磷酸腺苷存在下，使葡萄糖激酶或己糖激酶等磷酸化酶发生作用，将葡萄糖转化为葡萄糖－6－磷酸的方法；(2)在酶存在下，使葡萄糖氧化酶、吡喃糖氧化酶或山梨糖氧化酶等氧化酶发生作用，将葡萄糖转化为葡萄糖酸内酯的方法。

已知对于这些转化方法有各种改良。在(1)使用磷酸化酶的方法中，已知有使磷酸己糖异构酶以及6－磷酸果糖激酶发生作用，将葡萄糖转化为果糖－1，6－二磷酸，通过平衡反应防止葡萄糖－6－磷酸再转化为葡萄糖的方法(特开平5－76397号)；在氧化型辅酶存在下，使葡萄糖－6－磷酸脱氢酶发生作用的方法(特开平1－320998号公报、特开平3－27299号公报、特开平6－237794号公报)；在二磷酸腺苷存在下，使丙酮酸激酶发生作用，防止葡萄糖消失时三磷酸腺苷的浓度减小，保持一定的三磷酸腺苷浓度的方法(特开平2－104298号公报)等。在(2)使用氧化酶的方法中，已知有使葡萄糖氧化酶发生作用后，再使过氧化氢酶发生作用消除生成的过氧化氢的方法(特开平63－185397号公报)。

但是存在的问题是：将葡萄糖转化为其它物质时所使用的物质以及在该转化系统中转化生成的物质及其浓度等会使用于物质定量的酶反应系统受到影响。例如，欲使用葡萄糖激酶或己糖激酶消除葡萄糖时(特开平 5－76397 号公报)，存在生成大量二磷酸腺苷的问题。特别是，为了完全消除葡萄糖供给足够量的三磷酸腺苷时，会生成浓度为葡萄糖浓度 2 倍高的二磷酸腺苷，以至于无法忽视该二磷酸腺苷的影响。

1，5－脱水山梨醇存在于髓液、血浆、血清、尿中等生物体液中，在患有某种疾病特别是糖尿病时血浆中的量就会降低，作为糖尿病诊断标记是很有用的。1，5－脱水山梨醇具有酷似葡萄糖的结构，而且在量的方面与葡萄糖相比是微量的，因而其定量非常困难。

作用于 1，5－脱水山梨醇的酶有山梨糖氧化酶、吡喃糖氧化酶、己糖激酶、葡萄糖激酶、二磷酸腺苷依存性己糖激酶等。但是这些酶可以与 1，5－脱水山梨醇以外共存的葡萄糖等糖类发生反应，必须采用某种方法除去或消除葡萄糖等糖类。

在采用对使用可以催化 1，5－脱水山梨醇氧化反应的吡喃糖氧化酶或山梨糖氧化酶生成的过氧化氢进行定量的方法时，已知有下述消除葡萄糖的方法。

已知有(1)采用离子色谱柱将试样中的葡萄糖分离后，对试样中吡喃糖氧化酶发生作用生成的过氧化氢进行定量，从而定量 1，5－脱水山梨醇的方法(特开昭 63－185307 号公报、特开昭 64－6756 号公报)；(2)使葡萄糖激酶或己糖激酶以及葡萄糖－6－磷酸脱氢酶对试样中的葡萄糖发生作用，将葡萄糖转化为与吡喃糖氧化酶不发生反应的化合物后，对试样中吡喃糖氧化酶发生作用生成的过氧化氢进行定量，从而定量 1，5－脱水山梨醇的方法(特开平 1－320998 号公报、特开平 3－27299 号公报)；(3)使用葡萄糖激酶和丙酮酸激酶将试样中的葡萄糖转化为与吡喃糖氧化酶不发生反应的化合物后，对试样中吡喃糖氧化酶发生作用生成的过氧化氢进行定量，从而定量 1，5－脱水山梨醇的方法(特开平 2－104298 号公报)；(4)使己糖激酶、磷酸

己糖激酶、磷酸己糖异构酶以及6－磷酸果糖激酶对试样中的葡萄糖发生作用，将葡萄糖转化为与吡喃糖氧化酶不发生作用的化合物后，对试样中山梨糖氧化酶或吡喃糖氧化酶发生作用生成的过氧化氢进行定量，从而定量1，5－脱水山梨醇的方法(特开平5－76397号公报)等。

但是(1)所述的使用柱的方法存在操作复杂的问题，(2)～(4)所述的消除系统中，己糖激酶或葡萄糖激酶对1，5－脱水山梨醇也发生作用，生成1，5－脱水山梨醇－6－磷酸，因而难以正确的对1，5－脱水山梨醇进行定量。

在采用对使用可以催化1，5－脱水山梨醇发生磷酸化反应的己糖激酶、葡萄糖激酶或二磷酸腺苷依存性己糖激酶生成的物质进行定量的方法时，已知有下述方法。

(5)采用离子色谱柱将使用中的葡萄糖分离后，对试样中己糖激酶或葡萄糖激酶发生作用生成的二磷酸腺苷进行定量，从而定量1，5－脱水山梨醇的方法(特开平8－107796号)；(6)使(a)葡萄糖氧化酶或葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶、(b)葡萄糖脱氢酶、或(c)己糖激酶或葡萄糖激酶等酶对试样中的葡萄糖发生作用，将葡萄糖转化为与二磷酸腺苷依存性己糖激酶不发生反应的化合物后，对试样中二磷酸腺苷依存性己糖激酶以及1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶发生作用生成的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)进行定量，从而定量1，5－脱水山梨醇的方法(特开平10－191998号公报)。

但是，(5)的方法操作繁杂；(6)的方法中存在的问题是：使用葡萄糖氧化酶(a)的方法中，在被测液中存在高浓度葡萄糖时氧气的供给可以决定反应速度；使用葡萄糖脱氢酶(b)的方法中，由葡萄糖生成的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)的消除系统是必要的；使用己糖激酶或葡萄糖激酶(c)的方法中，由于1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶对由葡萄糖生成的葡萄糖－6－磷酸发生作用，不能分别进行定量，而且以来源于糖尿病患者等存在大量葡萄糖的试样作为测定对象时，在反应系统中生成大量二磷酸腺苷，使1，5－脱水山梨醇的定量变得不准确。

本发明的目的在于提供一种可以简便定量含葡萄糖试样中的特定物质例如1，5－脱水山梨醇的方法，定量试样中特定物质时可以实质上完全消除葡萄糖的消除方法、以及用于这些方法的试剂和试剂盒。

涉及含葡萄糖试样中1，5－脱水山梨醇的定量方法，其特征在于在含有葡萄糖的试样中将葡萄糖转化为果糖－1，6－二磷酸，并使可以将1，5－脱水山梨醇转化为1，5－脱水山梨醇－6－磷酸的酶系发生作用，使之生成1，5－脱水山梨醇－6－磷酸，然后在氧化型辅酶存在下使1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶发生作用，进行1，5－脱水山梨醇－6－磷酸的脱氢反应，对生成的还原型辅酶进行定量。

另外，本发明还涉及1，5－脱水山梨醇的定量用试剂，含有(a)二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶、6－磷酸果糖激酶、氧化型辅酶以及1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶，或者含有(b)选自三磷酸核苷依存性己糖激酶和三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶的一种与三磷酸核苷、磷酸己糖异构酶、6－磷酸果糖激酶、氧化型辅酶以及1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶。

另外，本发明还涉及1，5－脱水山梨醇的定量用试剂盒，该试剂盒由(a)含有二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶的试剂，或(b)含有选自三磷酸核苷依存性己糖激酶和三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶的一种与三磷酸核苷、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶的试剂，以及含有氧化型辅酶和1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶的试剂组成。

另外，本发明还涉及试样中葡萄糖的消除方法，其特征在于在二磷酸核苷和三磷酸核苷存在下，使二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶对试样中存在的葡萄糖发生作用，将葡萄糖转化为果糖－1，6－二磷酸。

另外，本发明还涉及消除葡萄糖用试剂，该试剂含有二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶。

另外，本发明还涉及含葡萄糖试样中成分的定量方法，其特征在

于在二磷酸核苷和三磷酸核苷存在下，使二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶对试样中的葡萄糖发生作用，将葡萄糖转化为果糖－1，6－二磷酸后，采用化学或酶反应对试样中的成分进行定量。

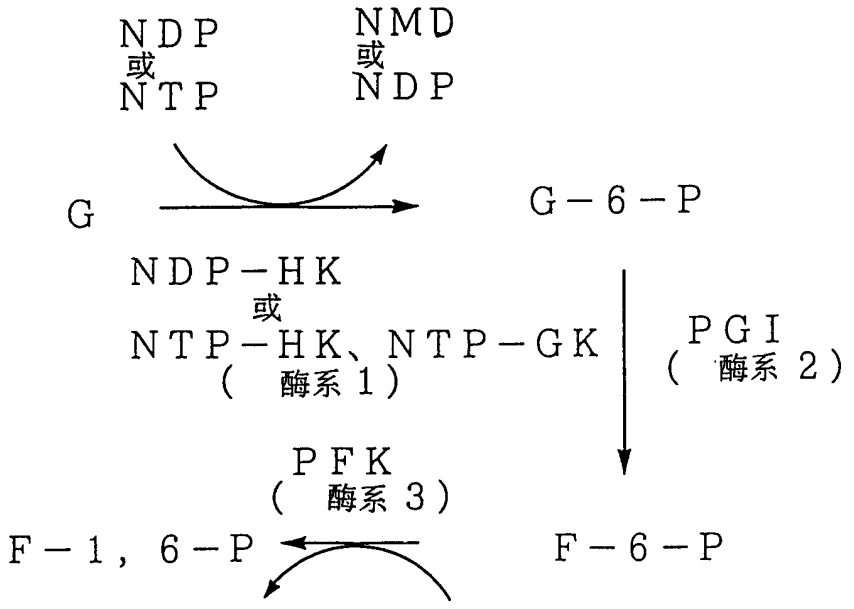
另外，本发明还涉及物质定量用试剂，该试剂含有二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶以及对需定量物质发生作用的酶或与需定量物质进行反应的物质。

另外，本发明还涉及物质定量用试剂盒，该试剂盒由含有二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶的试剂，以及含有对需定量物质发生作用的酶或与需定量物质进行反应的物质的试剂组成。

本发明中所处理的试样只要是有可能混有葡萄糖的试样即可，例如血液、血浆、血清、尿等生物体试样。

试样中葡萄糖的消除可以按照下述反应式通过将葡萄糖转化为果糖－1，6－二磷酸来进行。

【化1】



G: 葡萄糖、 G－6－P: 葡萄糖－6－磷酸

F－6－P: 果糖－6－磷酸

F－1，6－P: 果糖－1，6－二磷酸

NMD: 一磷酸核苷

NDP: 二磷酸核苷

NTP: 三磷酸核苷

NDP－HK: 二磷酸核苷依存性己糖激酶

NTP－HK: 三磷酸核苷依存性己糖激酶

NTP－GK: 三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶

PGI: 磷酸己糖异构酶

PFK: 6－磷酸果糖激酶

仅仅将葡萄糖转化为葡萄糖－6－磷酸时，由于反应是可逆反应，生成的葡萄糖－6－磷酸可以再转化为葡萄糖，在该反应系统中通过将葡萄糖最终转化为果糖－1，6－二磷酸，不会发生葡萄糖的再转化，试样中的葡萄糖可以完全消除。

将葡萄糖最终转化为果糖－1，6－二磷酸的酶系中可以含有由葡萄糖生成葡萄糖－6－磷酸的酶系(称为酶系 1)、由葡萄糖－6－磷酸生成果糖－6－磷酸的酶系(称为酶系 2)以及由果糖－6－磷酸生成果糖－1，6－二磷酸的酶系(称为酶系 3)。

在酶系 1 中包括下述两种: (a)酶是二磷酸核苷依存性己糖激酶，辅酶是二磷酸核苷，它向一磷酸核苷转化；以及(b)酶是三磷酸核苷依存性己糖激酶或三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶，辅酶是三磷酸核苷，它向二磷酸核苷转化。酶系 2 中酶是磷酸己糖异构酶。酶系 3 中，酶是 6－磷酸果糖激酶，辅酶是三磷酸核苷，它向二磷酸核苷转化。

在酶系 1 中，当酶是二磷酸核苷依存性己糖激酶，辅酶是向一磷酸核苷转化的二磷酸核苷时，相应于葡萄糖浓度需要消耗二磷酸核苷，但由于通过 6－磷酸果糖激酶可以生成与所消耗的二磷酸核苷等量的二磷酸核苷，因而二磷酸核苷可以保持一定浓度，不会由于试样

中所含葡萄糖浓度变化造成反应系统中存在的二磷酸核苷浓度改变。

在本发明中实施消除葡萄糖的方法时，是在有葡萄糖共存的试样中加入(a)二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶，或(b)选自三磷酸核苷依存性己糖激酶和三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶的一种与三磷酸核苷、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶，必要时在水性介质、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶存在下，在10～50℃条件下使之反应1～30分钟，优选2～10分钟。

二磷酸核苷依存性己糖激酶、三磷酸核苷依存性己糖激酶或三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶的浓度优选0.1～100U/ml，更优选0.5～50U/ml，特别优选1～50U/ml。

磷酸己糖异构酶的浓度优选0.1～100U/ml，更优选0.5～50U/ml，特别优选5～50U/ml。

6－磷酸果糖激酶的浓度优选0.1～100U/ml，更优选0.5～50U/ml，特别优选5～50U/ml。

各种酶都可以很容易购得市售品。例如二磷酸核苷依存性己糖激酶可以很容易从旭化成工业公司购得来源于litoralis热球菌(Thermococcus litoralis)或激烈热球菌(Pyrococcus furiosus)的酶，三磷酸核苷依存性己糖激酶可以很容易从亚洲酵母工业公司、东洋纺社、Boehringer Mannheim公司、旭化成工业公司等购得来源于酵母属(Saccharomyces)、Kluyveromyces属、芽胞杆菌属(Bacillus)等微生物的酶。三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶可以从Unitika公司等很容易地购得来源于发酵单胞菌属(Zymomonas)、芽胞杆菌属(Bacillus)等微生物的酶。磷酸己糖异构酶可以从Unitika公司购得来源于嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)的酶，6－磷酸果糖激酶可以从Unitika公司购得来源于嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)的酶。

二磷酸核苷或三磷酸核苷的浓度优选0.01～100mM,更优选0.1～

50mM，特别优选 1～10mM。赋活剂例如各种无机盐类，如硫酸镁、氯化镁等。无机盐类的浓度优选 0.001～10mg/ml，更优选 0.01～5mg/ml，特别优选 0.1～2mg/ml。

通过上述反应消除葡萄糖后，为了对试样中的物质进行定量，可以通过在必要试剂存在条件下进行反应，对反应生成的物质或减少的物质进行定量，从而定量目的物质。作为定量时的必要试剂没有特别的限定，例如含有对需定量物质发生作用的酶或与需定量物质进行反应的物质的试剂，优选含有酶的试剂。

对需定量物质发生作用的酶对葡萄糖也发生作用，而且当该酶所催化的反应受二磷酸核苷浓度影响时，消除葡萄糖的方法优选上述(a)酶是二磷酸核苷依存性己糖激酶，辅酶是向一磷酸核苷转化的二磷酸核苷。

这种酶例如核苷酸酶、6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶、二磷酸核苷焦磷酸酶、二磷酸核苷葡萄糖焦磷酸酶、二磷酸核苷依存性己糖激酶、1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶等。

当定量的对象为 1，5－脱水山梨醇时，由于上述用于消除葡萄糖的酶系发生作用的同时生成了 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸，通过对该 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸进行定量，可以定量试样中存在的 1，5－脱水山梨醇。

通过上述反应消除葡萄糖后，在氧化型辅酶存在下加入 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶，必要时水性介质、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶的存在下，在 10～50℃条件下使之反应 1～30 分钟，优选 2～10 分钟。1，5－脱水山梨醇的浓度通过直接测定反应生成的还原型辅酶在 340nm 的吸光度，或将该还原型辅酶衍生为其它物质后定量该物质来进行定量。

在不影响葡萄糖消除反应的范围内，定量 1，5－脱水山梨醇所使用的氧化型辅酶或 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶的任意一种也可以预先存在于葡萄糖消除反应的步骤中。

作为二磷酸核苷依存性己糖激酶，只要是以葡萄糖为基质消耗二磷酸核苷生成葡萄糖－6－磷酸和一磷酸核苷的酶，并以1，5－脱水山梨醇为基质消耗二磷酸核苷生成1，5－脱水山梨醇－6－磷酸和一磷酸核苷的酶，任何一种酶均可。二磷酸核苷依存己糖激酶例如来源于超高度嗜热菌激烈热球菌DSM3638株的酶(特开平9－234098号公报)、来源于litoralis热球菌(Thermococcus litoralis)的酶(TLHK)可以由旭化成工业公司购得。

作为三磷酸核苷依存性己糖激酶和三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶，只要是以葡萄糖为基质消耗三磷酸核苷生成葡萄糖－6－磷酸和二磷酸核苷的酶，并以1，5－脱水山梨醇为基质消耗三磷酸核苷生成1，5－脱水山梨醇－6－磷酸和二磷酸核苷的酶，任何一种酶均可。具体的说，可以举出上述酶系。

作为1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶，只要是由1，5－脱水山梨醇－6－磷酸和氧化性辅酶生成$C_6H_{11}O_8P_1$所示化合物和还原型辅酶的酶，任何一种酶均可。

【化2】

1，5－脱水山梨醇－6－磷酸＋氧化型辅酶

↓ 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶

$C_6H_{11}O_8P_1$＋还原型辅酶

催化该反应的酶——1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶例如来源于大肠杆菌(E.coli) DH1(ATCC33849)株的酶。该酶可以按照特开平10－84953号公报的记载来调制。

反应液中1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶的浓度优选0.5～100U/ml，更优选1～50Uml，特别优选2～40Uml。反应液中氧化型辅酶的浓度优选0.1～100mM，更优选1～50mM，特别优选2～20mM。

反应液中二磷酸核苷依存性己糖激酶、三磷酸核苷依存性己糖激酶、三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶、磷酸己糖异构酶和6－磷酸果糖激酶、二磷酸核苷、三磷酸核苷的浓度与上述葡萄糖消除反应中所使用的浓度相同。

氧化型辅酶例如氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)、硫代 NAD、硫代 NADP。

三磷酸核苷例如三磷酸腺苷、三磷酸鸟苷、三磷酸胞甙、三磷酸硫胺、三磷酸尿苷、三磷酸肌苷等，优选三磷酸腺苷。

二磷酸核苷例如二磷酸腺苷、二磷酸鸟苷、二磷酸胞苷、二磷酸硫胺、二磷酸尿苷、二磷酸肌苷等，优选二磷酸腺苷。

将生成的还原型辅酶衍生为其它物质后进行高灵敏度定量的方法，例如下式所示在四唑鎓盐存在下使电子受体发生作用，对生成的甲臜色素进行比色定量的方法。

【化 3】

还原型辅酶 + 四唑鎓盐

↓电子受体

氧化型辅酶 + 甲臜色素

四唑鎓盐例如吲哚硝基四唑鎓(INT)、硝基蓝四唑鎓(NBT)、2－(4－碘代苯基)－3－(4－硝基苯基)－5－(2，4－二磺酰基)－2H－四唑鎓一钠盐(以下简称为 WST－1)、2－(4－碘代苯基)－3－(2，4－二硝基苯基)－5－(2，4－二磺酰基)－2H－四唑鎓一钠盐(以下简称为 WST－3)、3，3'－〔3，3'－二甲氧基－(1，1'－二苯基)4，4'－二基〕－双〔2－(4－硝基苯基)－5－苯基－2H－四唑鎓氯化物〕(NTB)、3－(4，5－二甲基噻唑－2－苯基)－5－(3－羧基甲氧基苯基)－2－(4－硫代苯基)－2H－四唑鎓盐(MTS)等。

用作色原体的四唑鎓盐也可以使用。为了达到增加灵敏度的目的，优选分子吸光系数大的四唑鎓盐。通常如果考虑到可以用于临床，优选还原后转化为水溶性甲臜色素的四唑鎓盐。因此，WST－1 或 WST－3 等是较合适的。临床上使用时，其用量优选 0.01～50mM。

本发明使用的四唑鎓盐在反应液中的初期浓度为 0.01～50mM，优选 0.05～10mM。

电子受体例如吩嗪甲氧硫酸盐、1－甲氧基－5－甲基吩嗪甲氧硫酸盐、Meldola's Bule 和黄递酶。黄递酶例如来源于巨大芽孢杆菌

(Bacillus megaterium)，可以由旭化成工业公司和东洋纺社购得。

本发明使用的电子受体在反应液中的初期浓度为0.01～50mM，优选0.05～10mM。

反应是在10～50℃进行1～30分钟，优选2～10分钟。该反应也可以在上述生成还原型辅酶的反应结束后再进行，但优选同时进行。

另外，将生成的还原型辅酶衍生为其它物质进行定量的其它方法，例如下式所示在色原体存在下使还原型辅酶氧化酶和过氧化酶发生作用，对生成的色素进行比色定量的方法。色原体也可以是与4-氨基安替比林组合后使用的色原体，但优选单独使用转化为色素的色原体。

【化4】

$$\text{还原型辅酶} + O_2 \xrightarrow{\text{还原型辅酶氧化酶}} \text{氧化型辅酶} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{色原体} \xrightarrow{\text{过氧化酶}} \text{色素}$$

可以单独使用的色原体例如二〔3-二(4-氯苯基)-甲基-4-二甲氨基苯基〕胺(BCMA)、二〔3-二(4-氯苯基)-甲基-4-羧基乙氨基苯基〕胺、10-N-甲氨基甲酰基-3，7-二甲氨基-10H-吩噻嗪(MCDP)、10-N-羧基甲基氨基甲酰基-3，7-二甲氨基-10H-吩噻嗪(CCAP)等。

另外，与4-氨基安替比林组合使用的色原体例如N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰乙烯二胺(EMSE)、N-乙基-N-(2-羟基-3-硫代丙基)-间甲苯胺(TOOS)、N，N-二(4-硫代丁基)-间甲苯胺二钠盐等。

反应是在10～50℃进行1～30分钟，优选2～10分钟。该反应也可以在上述生成还原型辅酶的反应结束后进行，但优选同时进行。

水性介质例如是含有缓冲剂、食盐等的水等液体，优选缓冲液。

缓冲剂例如乳酸缓冲剂、枸橼酸缓冲剂、醋酸缓冲剂、琥珀酸缓冲剂、邻苯二甲酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、三乙醇胺缓冲剂、二乙醇胺缓冲剂、赖氨酸缓冲剂、巴比妥缓冲剂、tris(羟甲基)氨基甲烷缓冲剂、咪唑缓冲剂、苹果酸缓冲剂、草酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、硼酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、Good's 缓冲剂等。

酶活性调节剂例如 1，10－菲咯啉等金属螯合剂，甘露醇、甘油等糖醇，镁、锰、锌、铜等金属离子，碘代醋酸、碘代乙酰胺等 SH 抑制剂。

酶的稳定剂例如乙二胺四乙酸等金属螯合剂，可溶性淀粉等多糖类或其衍生物，白蛋白、球蛋白等蛋白质，聚乙二醇等水溶性高分子化合物，磷化氢、胱氨酸等含有 SH 基的化合物等。

表面活性剂例如聚氧乙烯辛基苯基醚(非离子 HS－210，花王社生产)、3－〔(3－氯醛甲酰胺丙基)二甲氨基〕丙磺酸、三硝基甲苯 X－100、十二烷基硫酸钠等。

防腐剂例如叠氮化钠等。

其它酶例如氧化型辅酶氧化酶、过氧化酶等。

本发明的 1，5－脱水山梨醇的定量用试剂含有(a)二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶、6－磷酸果糖激酶、氧化型辅酶以及 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶，或者含有(b)选自三磷酸核苷依存性己糖激酶和三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶的一种与三磷酸核苷、磷酸己糖异构酶、6－磷酸果糖激酶、氧化型辅酶以及 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶，必要时还含有上述缓冲剂、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶等。

这些试剂可以制成 1，5－脱水山梨醇定量用试剂盒，该试剂盒由第一试剂和第二试剂组成，1)第一试剂含有(a)二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和 6－磷酸果糖激酶，或者(b)选自三磷酸核苷依存性己糖激酶和三磷酸核苷依存性葡萄糖激酶的一种与三磷酸核苷、磷酸己糖异构酶、6－磷酸果糖激酶，必

要时还含有上述缓冲剂、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶等。2)第二试剂含有 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶以及氧化型辅酶，必要时还含有上述缓冲剂、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶等。也可以使第二试剂中含有 1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶和氧化型辅酶的任意一种，使第一试剂中含有另一种。

本发明的葡萄糖消除用试剂含有二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和 6－磷酸果糖激酶，必要时还含有上述缓冲剂、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶等。

本发明的物质定量用试剂由二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和 6－磷酸果糖激酶以及对需定量物质发生作用的酶或与需定量物质进行反应的物质组成，必要时还含有上述缓冲剂、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶等。

该定量试剂可以制成试剂盒，该试剂盒含有第一试剂和第二试剂，1)第一试剂含有二磷酸核苷、三磷酸核苷、二磷酸核苷依存性己糖激酶、磷酸己糖异构酶和 6－磷酸果糖激酶，必要时还含有上述缓冲剂、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶等；2)第二试剂由对需定量物质发生作用的酶或与需定量物质进行反应的物质组成，必要时还含有上述缓冲剂、酶活性调节剂、赋活剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、色原体、电子受体、四唑鎓盐、其它酶及其基质或辅酶等。

本发明的各种试剂可以调制成冷冻干燥品后供给，也可以溶解于水等液体中供给。

以下给出具体的实施例。

实施例 1

调制具有下述组成的葡萄糖消除用试剂。

tris－HCL 缓冲液(pH8.0)	50mM
氯化镁	1mg/ml
二磷酸腺苷依存性己糖激酶	
(来源于 Thermococcus litoralis，旭化成工业公司生产)	10U/ml
磷酸己糖异构酶	
(来源于嗜热脂肪芽孢杆菌，Unitika 公司生产)	40U/ml
6－磷酸果糖激酶	
(来源于嗜热脂肪芽孢杆菌，Unitika 公司生产)	30U/ml
二磷酸腺苷(亚洲酵母待业公司生产)	3mM
三磷酸腺苷(Sigma 公司生产)	10mM

实施例 2

调制具有下述组成的 1，5－脱水山梨醇定量用试剂。

试剂 1

tris－HCL 缓冲液(pH8.0)	50mM
氯化镁	1mg/ml
NADP(Sigma 公司生产)	4mM
二磷酸腺苷(亚洲酵母待业公司生产)	3mM
三磷酸腺苷(Sigma 公司生产)	10mM
磷酸己糖异构酶	
(来源于嗜热脂肪芽孢杆菌，Unitika 公司生产)	40U/ml
6－磷酸果糖激酶	
(来源于嗜热脂肪芽孢杆菌，Unitika 公司生产)	30U/ml
黄递酶	
(来源于巨大芽孢杆菌，旭化成工业公司生产)	10U/ml
二磷酸腺苷依存性己糖激酶	
(来源于 Thermococcus litoralis，旭化成工业公司生产)	10U/ml

试剂 2

甘氨酸－NaOH 缓冲液(pH10.0)	200mM
WST－1(同仁化学公司生产)	0.5mM
1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶(来源于 E.coli DH1(ATCC33849)株，旭化成工业公司生产)	20U/ml

实施例 3

将 1，5－脱水山梨醇的 25μg/ml 标准溶液稀释成具有不同浓度的 5 种溶液作为试样。在 0.075ml 试样和精制水中加入 2.25ml 实施例 2 调制的试剂 1，在 37℃下加热 5 分钟，之后加入 0.75ml 实施例 2 调制的试剂 2，再使之反应 5 分钟，在 438nm 处测定吸光度。这时得到的标定曲线如图 1 所示。

实施例 4

进行葡萄糖消除试验以确定本方法的有效性。在试管内分别注入 2.25ml 实施例 2 的试剂 1，分别加入(a)精制水、(b)含有 1，5－脱水山梨醇 25μg/ml 的检测液、(c)含有葡萄糖 2000mg/dl 的检测液、(d)含有 1，5－脱水山梨醇 25μg/ml 和葡萄糖 2000mg/dl 的检测液 0.075ml，在 37℃条件下加热 5 分钟后，0.75ml 加入实施例 7 的试剂 2，再使之反应 5 分钟，在 438nm 处测定吸光度得到表 1 的结果。

【表 1】

	检测液	测定值
(a)	精制水(空白)	0.096Abs
(b)	1，5－AG 25μg/ml	0.230Abs
(c)	葡萄糖 2000mg/dl	0.096Abs
(d)	1，5－AG＋葡萄糖	0.226Abs

如表 1 的结果所示，(c)与(a)的值完全一致，采用本法可以完全消除(c)检测液中的葡萄糖 2000mg/dl。另外，(b)与(d)的值几乎相同，因而可以说明本发明的有效性。

实施例 5

为了明确本发明与公知方法的相关性，使用50例血清测定1，5－脱水山梨醇的浓度。(a)分别注入2.25ml实施例2的试剂1，加入0.075ml血清，在37℃条件下加热5分钟后，添加0.75ml试剂2，再使之反应5分钟，在438nm处测定吸光度，根据实施例1图1的标定曲线得到的计算公式算出血清中1，5－脱水山梨醇的浓度。(b)使用已被批准的体外诊断用药品“Lana 1，5－AG Auto II”(日本化药社生产 批准编号(08AM)第0112号)，按照“测定操作方法”测定50例血清，同样按照其中的“1，5－脱水山梨醇浓度的求法”算出1，5－脱水山梨醇的浓度。分别将(a)得到的值按纵轴绘制，将(b)得到的值按横轴绘制，得到图2的结果。

如图2的结果所示，相关系数r＝0.9966，回归方程y＝0.9839x＋0.0576，具有良好的相关性。

实施例6

第一试剂的二磷酸腺苷浓度如表2所示，另外除在第二试剂中加入三硝基甲苯X－100使之达到0.4％以外，调制与实施例2相同的试剂。

制成含有1，5－脱水山梨醇25μg/ml以及表2所示浓度的葡萄糖的试样。

采用与实施例3相同的操作，对1，5－脱水山梨醇进行定量。结果如表2所示。

【表2】

葡萄糖浓度	二磷酸腺苷浓度(mM)							
(mg/dl)	0.5	1	2	3	4	5	6	10
0	25.2	25.1	25.0	25.0	25.2	25.1	25.1	25.0
400	25.0	25.1	25.1	25.0	25.1	25.1	25.1	25.0
800	24.9	25.2	25.0	25.0	25.2	25.0	25.1	25.1
1200	24.8	25.0	24.9	25.1	25.1	25.1	25.3	25.2
1600	24.8	25.0	24.8	25.0	25.1	25.2	25.2	25.3
2000	24.8	25.1	25.0	25.1	25.2	25.3	25.3	25.6

如果采用本实施例所采用的使用二磷酸腺苷依存性己糖激酶消除葡萄糖的方法，即使改变试剂中二磷酸腺苷的浓度，且试样中含有各种不同浓度的葡萄糖，也与这些条件无关，可以正确的定量1，5－脱水山梨醇。

实施例7

调制具有下述组成的1，5－脱水山梨醇定量用试剂。

试剂1

tris－HCL缓冲液(pH8.0)	50mM
氯化镁	1mg/ml
NADP(Sigma公司生产)	4mM
三磷酸腺苷(Sigma公司生产)	10mM
磷酸己糖异构酶	
(来源于嗜热脂肪芽孢杆菌，Unitika公司生产)	40U/ml
6－磷酸果糖激酶	
(来源于嗜热脂肪芽孢杆菌，Unitika公司生产)	30U/ml
黄递酶	
(来源于巨大芽孢杆菌，旭化成工业公司生产)	100U/ml
三磷酸腺苷依存性己糖激酶	
(来源于Thermococcus litoralis，旭化成工业公司生产)	10U/ml

试剂2

甘氨酸－NaOH缓冲液(pH10.0)	200mM
WST－1(同仁化学公司生产)	0.5mM
1，5－脱水山梨醇－6－磷酸脱氢酶	
(来源于E.coli DH1(ATCC33849)株，旭化成工业公司生产)	20U/ml

实施例8

制成1，5－脱水山梨醇浓度为50、100、150、200和250μg/ml

的标准溶液。在 0.075ml 该标准溶液或精制水中加入 2.25ml 实施例 7 调制的试剂 1，在 37℃条件下加热 5 分钟，之后加入 0.75ml 实施例 7 调制的试剂 2，再反应 5 分钟，在 438nm 处测定吸光度。这时得到的标定曲线如图 3 所示。

实施例 9

进行葡萄糖消除试验以确定本方法的有效性。在试管内分别注入 2.25ml 实施例 7 的试剂 1，分别加入(a)精制水、(b)含有 1，5－脱水山梨醇 250μg/ml 的检测液、(c)含有葡萄糖 100mg/dl 的检测液、(d)含有 1，5－脱水山梨醇 250μg/ml 和葡萄糖 100mg/dl 的检测液 0.075ml，在 37℃条件下加热 5 分钟后，加入 0.75ml 实施例 7 的试剂 2，再使之反应 5 分钟，在 438nm 处测定吸光度得到表 3 的结果。

【表 3】

	检测液	测定值
(a)	精制水(空白)	0.280Abs
(b)	1，5－AG 250μg/ml	0.440Abs
(c)	葡萄糖 100mg/dl	0.279Abs
(d)	1，5－AG＋葡萄糖	0.441Abs

1，5－AG：1，5－脱水山梨醇

如表 3 的结果所示，(c)与(a)的值几乎一致，采用本法可以完全消除(c)检测液中的葡萄糖 100mg/dl。另外，(b)与(d)的值几乎相同，因而可以说明本发明的有效性。

按照本发明可以提供一种简便的 1，5－脱水山梨醇定量方法及其所使用的定量用试剂和定量用试剂盒。而且即使有高浓度的葡萄糖共存，也可以由酶完全消除，得到正确的测定值。

另外，按照本发明可以提供一种使反应液中存在的二磷酸核苷浓度保持一定，同时通过将反应液中的葡萄糖转化为葡萄糖－1，6－二磷酸消除葡萄糖的方法，及其所使用的消除用试剂。

【附图说明】

【图 1】表示 1，5－脱水山梨醇的标定曲线。横轴的 1，5－AG

表示 1，5－脱水山梨醇，纵轴的 mAbs 表示毫吸光度。

【图 2】表示采用本法得到的 1，5－脱水山梨醇浓度(a: 纵轴)与采用对照方法(Lana 1，5－AG auto)得到 1，5－脱水山梨醇浓度(b: 横轴)的相关图。

【图 3】表示 1，5－脱水山梨醇的标定曲线。

图 1

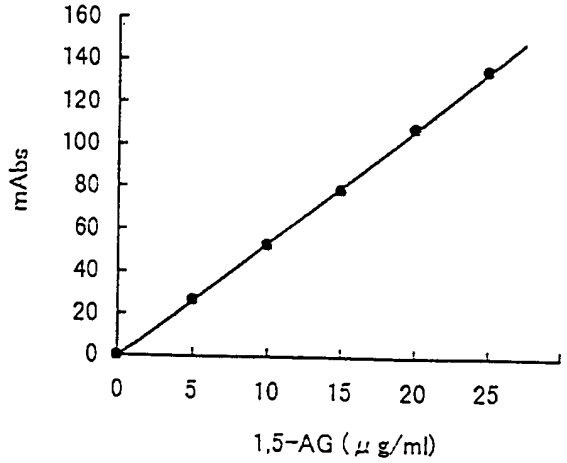

160
140
120
100
80
60
40
20
0
mAbs
0
5
10
15
20
25
1,5-AG (μg/ml)

图 2

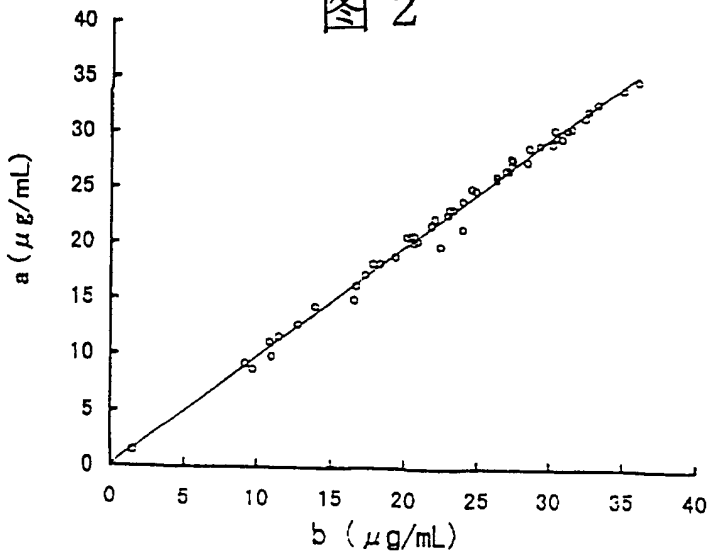
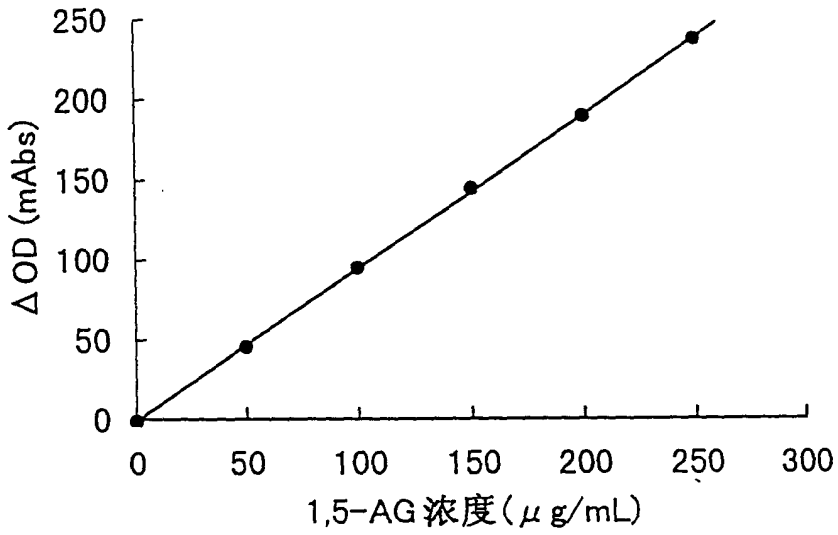

40
35
30
25
20
15
10
5
0
a (μg/mL)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
b (μg/mL)

图 3


250
200
150
100
50
0
ΔOD (mAbs)
0
50
100
150
200
250
300
1,5-AG浓度(μg/mL)